

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**ANÁLISIS QUÍMICO MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y
ESPECTROSCÓPICAS DEL ANTIBIÓTICO PRODUCIDO POR LOS
GÉNEROS *Stenotrophomonas* Y *Burkholderia* AISLADOS DE MUESTRAS DE
SUELO**

AUTOR:

LOZADA TONATO HENRY OMAR

TUTORA:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, febrero del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Henry Omar Lozada Tonato con documento de identificación N° 1721265435, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas del antibiótico producido por los géneros *Stenotrophomonas* y *Burkholderia* aislados de muestras de suelo”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(Firma)



Henry Omar Lozada Tonato

CI: 1721265435

Quito, febrero del 2018

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas del
antibiótico producido por los géneros *Stenotrophomonas* y *Burkholderia* aislados de
muestras de suelo” realizado por Henry Omar Lozada Tonato obteniendo un producto
que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica
Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2018

(Firma)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Elena Maldonado Rodríguez', written over a horizontal dotted line.

María Elena Maldonado Rodríguez

CI: 1707743157

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico con mucho amor a mi padre Fredy Lozada y mi madre Beatriz Tonato que, gracias a su apoyo incondicional durante el transcurso de estos años de mi vida estudiantil, me han ayudado a concluir los estudios universitarios y hacer posible este logro, a mi hermano Geovanni Lozada que me acompaño siempre y a mi novia Guissela que durante estos años ha sido importante en mi vida y de gran apoyo moral y sentimental.

Es el inicio de una nueva etapa, nuevos retos y desafíos están por venir.

¡A enfrentarlos!

Henry Omar Lozada Tonato

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana que me abrió las puertas para culminar mis estudios y me ha dado las herramientas para ser un excelente profesional.

A mi tutora de tesis, Ph.D. María Elena Maldonado que me ha dado la oportunidad de trabajar en un interesante e importante proyecto de investigación además de poner su total confianza en mí para desarrollarlo, todos sus conocimientos y consejos que han sido de gran ayuda para la culminación de este trabajo.

Al Laboratorio de Ciencias de la Vida y todos sus ayudantes que han sido partícipes apoyando y facilitando el trabajo en el laboratorio.

A un gran profesor Ph.D. Paco Noriega Rivera por su ayuda en este trabajo y a mis compañeros que apoyaron con la investigación en el inicio de este proyecto María José Apráez y Diego Alexander Guzmán.

En especial a todos los profesores que durante toda mi carrera han aportado con un granito de arena en mi formación y durante el desarrollo de la tesis, gracias por compartir sus consejos, anécdotas, experiencias y conocimientos que han hecho de mí un gran profesional.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
1. Marco Conceptual	4
1.1. Los Microorganismos	4
1.1.1. Los Géneros Bacterianos.....	5
1.2. Los Antibióticos	7
1.2.1. Principales grupos de fármacos antimicrobianos.....	8
1.2.2. Aislamiento y Caracterización	10
1.2.3. Purificación de los antibióticos	11
1.3. Separación analítica.....	12
1.4. Separación de analitos presentes en mezclas líquidas	13
1.4.1. Separación por Extracción	15
1.4.2. Separación por Cromatografía	17
1.5. Actividad Antimicrobiana	20
1.5.1. Método de microdilución en caldo	20
1.5.2. Bioautografía	21
1.6. Técnicas Espectroscópicas de Análisis	23
1.6.1. Espectroscopia de absorción infrarroja (IR)	24
Capítulo 2.....	26
2. Metodología	26

2.1. Etapa 1: Reactivación de las cepas microbianas seleccionadas	26
2.2. Etapa 2: Inóculo en biorreactor	26
2.2.1. Preparación del medio de cultivo ISP2	26
2.2.2. Preparación del overnight de las cepas seleccionadas	27
2.3. Etapa 3: Extracción del antibiótico	27
2.4. Etapa 4: Análisis del compuesto extraído	28
2.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	28
2.4.2. Análisis del antibiótico en Cromatografía en Capa Fina (TLC)	31
2.4.3. Bioautografía o Bioensayo.....	33
2.4.4. Espectro infrarrojo de los antibióticos obtenidos	35
Capítulo 3	36
3. Resultados y Discusión	36
3.1. De la extracción del antibiótico	36
3.2. Análisis del compuesto extraído.....	37
3.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	37
3.2.2. Del análisis del antibiótico en Cromatografía en Capa Fina (TLC)	38
3.2.3. Bioautografía o Bioensayo.....	39
3.2.4. Del Espectro Infrarrojo	41
Conclusiones	43
Recomendaciones.....	45
Referencias	46
Anexos	55

Índice de tablas

Tabla 1. Importancia relativa de los grupos microbianos productores de antibióticos.	5
Tabla 2. Clasificación de los principales grupos de fármacos antimicrobianos.....	8
Tabla 3. Algunos antibióticos producidos comercialmente.	10
Tabla 4. Métodos de separación.	13
Tabla 5. Clasificación de las técnicas de separación según el origen de la segunda fase.	14
Tabla 6. Polaridad y orden de elución de disolventes orgánicos.	18
Tabla 7. Diseño de la bandeja de microdilución con la concentración de antibiótico usada en mg/mL.	30
Tabla 8. Fases móviles para la cromatografía de antibióticos.....	31
Tabla 9. Peso obtenido del antibiótico extraído con diclorometano en medio ISP2.	36
Tabla 10. Absorbancias descritas usando el equipo microplate reader mediante la técnica de microdilución.	38
Tabla 11. Localización de la zona de inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i> mediante bioautografía.	40
Tabla 12. Medidas de los halos inhibición contra <i>Bacillus spizizenii</i> en placas TLC después de la bioautografía.	41

Índice de figuras

Figura 1. Proceso global de extracción y purificación.....	12
Figura 2. Extracción con embudo de separación o decantación.	16
Figura 3. Montaje típico para cromatografía en capa fina TLC.....	17
Figura 4. Microdilución en caldo para pruebas de susceptibilidad antibacteriana. ..	21
Figura 5. Reacción de una sal de tetrazolio	22
Figura 6. Tipos de Bioautografía.	23
Figura 7. Regiones del espectro electromagnético utilizados en espectroscopia analítica.	25

Índice de anexos

Anexo 1. Antibiótico producido por las tres cepas bacterianas extraído con solvente diclorometano y concentrado en rotavapor.	55
Anexo 2. Placa de microdilución en caldo usada para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	55
Anexo 3. Cromatografía "TLC" de los antibióticos con una concentración de 50 mg/mL observadas bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y a 365 nm (fluorescencia).	56
Anexo 4. Cromatografía en capa fina "TLC" revelado con vainillina.	56
Anexo 5. Bioautografía de antibióticos, muestra con volumen de 5 µL, 10 µL y 20 µL y una concentración de 100 mg/mL.	57
Anexo 6. Halos de inhibición producido por los antibióticos extraídos sin eluir la placa cromatográfica.....	57
Anexo 7. Espectros infrarrojos de las cepas productoras de antibióticos.	58

Resumen

El descubrimiento de nuevos fármacos y de estructuras químicas activas contra bacterias patógenas, se ha logrado a partir del estudio del metabolismo secundario de microorganismos producidos bajo condiciones controladas, al incubar en un medio de cultivo líquido en estas condiciones cepas bacterianas capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias producto de su metabolismo secundario, se obtiene un antibiótico o metabolito secundario de interés.

El trabajo experimental se enfocó en la producción del antibiótico generado por bacterias aisladas del suelo, identificadas mediante pruebas bioquímicas como *Burkholderia cepacia* (PAG C007), *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019) haciendo uso de un biorreactor en condiciones controladas. Además, se logró extraer el antibiótico mediante la técnica de extracción líquido-líquido.

Se purificó la mezcla antibiótica mediante cromatografía en capa fina (TLC), identificando las fracciones con actividad antimicrobiana mediante bioautografía de inmersión en agar, para finalmente identificar mediante el uso de espectroscopía infrarroja (IR) los principales grupos funcionales que componen la molécula antimicrobiana.

Palabras clave: antibióticos, bioautografía, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Abstract

The discovery of new drugs and active chemical structures against pathogenic bacteria has been achieved from the study of the secondary metabolism of microorganisms produced in controlled conditions, incubating in a liquid culture medium in these conditions bacterial strains capable of inhibiting the growth of other bacteria, is obtained the antibiotic or secondary metabolite of interest.

The experimental work focused on the production of the antibiotic generated by bacteria isolated from soil, identified by biochemical tests such as *Burkholderia cepacia* (PAG C007), *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019) using a bioreactor in controlled conditions. In addition, the antibiotic was extracted using the liquid-liquid extraction technique.

The antibiotic mixture was purified by thin layer chromatography (TLC), identifying the factions with antimicrobial activity by means of agar bioautography and finally identifying by the use of Infrared spectroscopy (IR) the main functional groups that make up the antimicrobial molecule.

Key words: antibiotics, bioautography, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Introducción

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por organismos vivos (generalmente microorganismos), estas sustancias suprimen el crecimiento o en algunos casos eliminan otros microorganismos utilizando concentraciones bajas de antibiótico. Actualmente el término antibióticos se extiende a agentes antibacterianos sintéticos tales como las sulfonamidas o quinolonas entre otros. A pesar de que estas sustancias son muy comunes en el mundo microbiano no fue hasta los años cuarenta que su verdadero potencial en la medicina fue reconocido y la producción a gran escala se desarrolló (Choma, 2013).

Más de la mitad de los antibióticos de uso clínico se derivan de productos naturales (metabolitos secundarios) de hongos y bacterias, la mayoría de estos se introdujeron en la medicina a partir de 1941 durante la denominada "edad de oro" de los antibióticos, generando en los últimos 50 años un uso indebido de estos fármacos a pesar de su indispensable uso clínico, dando lugar a un aumento alarmante de la resistencia a los antimicrobianos (RAM), que es sin duda el mayor desafío que los seres humanos enfrentarán este siglo por lo que la investigación se ha intensificado para descubrir nuevas moléculas bioactivas (Qin et al., 2017).

Según Choma & Jesionek, (2015), la búsqueda de nuevos antibióticos naturales que superan la resistencia a fármacos de microflora patógena es una solución viable a este problema ya que enfermedades microbianas aumentan año tras año y se están convirtiendo en una gran amenaza para la salud pública.

La Química de los Productos Naturales se refiere a la investigación de metabolitos secundarios o “metabolitos especiales” de fuentes naturales de origen vegetal, animal, marino, fúngico y bacteriano por lo que se consideran productos naturales a todos los

compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundario que, independientemente del peso molecular, se producen en dichos organismos vivos como respuesta ante condiciones extremas, ya sea: estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiante, siendo en general señales químicas frente a plagas, patógenos y simbiosis con otros organismos. Estos son justamente compuestos de interés porque poseen en su estructura química algunas subestructuras que son bioactivas en organismos animales, incluido el hombre (Pomilio, 2012).

Como lo menciona Alghuthaymi & Abdullah, (2014), “En los últimos años el descubrimiento de nuevos fármacos y de estructuras químicas ha llegado en la mayoría de casos a partir de fuentes naturales”. Por lo que, al encontrar nuevas sustancias antimicrobianas cabe la necesidad de detectar y cuantificar los antibióticos producto del metabolismo secundario de dichas fuentes, utilizando distintas técnicas instrumentales para la identificación y cuantificación de fármacos entre ellos los antibióticos, siendo las técnicas cromatográficas y espectroscópicas las de más amplio alcance (Talero-Pérez, Medina, & Rozo-Núñez, 2013).

Para la presente investigación, se tomó como referencia los resultados descritos en el trabajo “Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales del Ecuador” realizado por Egas & Tinajero (2016), donde las cepas aisladas del suelo identificadas mediante kit comercial como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* produjeron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633). Por lo cual, es conveniente realizar la producción de este antibiótico en volúmenes mayores, haciendo uso de un biorreactor para garantizar las condiciones de cultivo, lo que fomentará la producción de sustancias antimicrobianas para la obtención de una mayor cantidad de metabolitos secundarios para su posterior análisis. Adicionalmente se purificará el antibiótico

extraído mediante técnicas cromatográficas facilitando el análisis químico de los metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana producidos por los microorganismos aislados de suelos. Finalmente se realizará la identificación de los principales grupos funcionales que componen la molécula bioactiva con la información que nos proporcionan las técnicas espectroscópicas como la espectroscopia infrarroja (IR).

Capítulo 1

1. Marco Conceptual

1.1. Los Microorganismos

Los microorganismos generalmente viven en ambientes naturales que son ideales para su crecimiento y desarrollo, pueden encontrarse interaccionando con otras poblaciones de microorganismos ya sea en sinergia, antagonismo, etc., adaptándose a las características físicas y químicas de su entorno generando como consecuencia de esas interacciones metabolitos secundarios con actividades biológicas que son fundamentales para su sobrevivencia (Cano, 2011).

“Los microorganismos capaces de producir sustancias de interés comercial son considerados como industriales, en un grado considerable son especialistas metabólicos capaces de producir específicamente y con un alto rendimiento metabolitos particulares o sustancias de interés industrial” (Madigan, 2009, p. 817).

Entre las sustancias de interés industrial más importantes producidas por bacterias son las denominadas sustancias antimicrobianas. En la tabla 1 se muestra la importancia relativa de algunos grupos microbianos productores de estas sustancias antimicrobianas.

Según indica (Sierra-García, Romero-Tabarez, & Orduz-Peralta, 2012).

La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de metabolitos secundarios producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, hipocolesterolémicos, inmunosupresores, antiparasitarios, herbicidas e insecticidas, entre otros.

Tabla 1. Importancia relativa de los grupos microbianos productores de antibióticos.

Microorganismos productores de antibióticos	% Total de los antibióticos hallados de microorganismos
Líquenes y algas	0,8
Hongos	
<i>Penicillium</i>	4,1
<i>Aspergillus</i>	3,0
<i>Fusarium</i>	1,2
<i>Cephalosporium</i>	0,8
Otros hongos	5,4
Basidiomicetos y ascomicetos	5,0
Bacterias	
<i>Pseudomonadaceae</i>	1,3
<i>Bacillaceae</i>	7,0
Otras eubacterias	1,7
Actinomicetos	69,7

Nota: Adaptado de *Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial* (Leveau, García, & Bouix, 2000, p. 418), por el autor, 2018.

1.1.1. Los Géneros Bacterianos

1.1.1.1. Género *Burkholderia*

El género *Burkholderia* representa un grupo en rápida expansión de bacterias no fermentativas Gram-negativas que se encuentran en todo el mundo en prácticamente todos los entornos posibles. Un grupo dentro del género *Burkholderia* es conocido como el complejo de *Burkholderia cepacia* (Bcc). A este complejo se lo cataloga como patógenos raros y potencialmente mortales en pacientes con fibrosis quística (FQ), pero simultáneamente han sido estudiados intensivamente por sus aplicaciones biotecnológicas (Depoorter et al., 2016).

Según indica (Bolívar-Anillo, Contreras-Zentella, & Teherán-Sierra, 2016, p. 102).

El género *Burkholderia* con más de 90 especies reportadas hasta la fecha, se encuentra dividido en dos grupos mayores filogenéticamente distantes. El

primer grupo se encuentra constituido por especies patógenas donde destacan los patógenos oportunistas referidos como el complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc); el otro grupo está conformado por especies no patógenas con habilidades para la promoción del crecimiento vegetal y la rizoremediación.

“Las bacterias del género *Burkholderia* son organismos increíblemente versátiles, con una capacidad fenomenal para la producción de metabolitos secundarios” (Cimermanic et al., 2014). Se han descubierto propiedades antibacterianas e insecticidas que son producidas por cepas de este género, entre los más destacados se encuentra la pirrolnitrina un potente antimicótico y antibacteriano producido por cepas de *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Myxococcus*, *Serratia* y *Enterobacter* (el-Banna & Winkelmann, 1998), xylocandin (Bisacchi et al., 1987), cepafungin/glidobactin (Schellenberg, Bigler L Fau - Dudler, & Dudler, 2007) altericidin (Kirinuki, Ichiba, & Katayama, 1984), cepacin (Parker Wl Fau - Rathnum et al., 1984), cepaciamides (Jiao, Yoshihara, Ishikuri, Uchino, & Ichihara, 1996), phenazines (Cartwright, Chilton, & Benson, 1995) y derivados de quinolina (Moon, Kang, Park, & Kim, 1996).

1.1.1.2 Género *Stenotrophomonas*

Antiguamente clasificada dentro de los géneros *Pseudomonas* (1961) y *Xanthomonas* (1983). En 1993 se propone el nuevo género *Stenotrophomonas* el cual se encuentra constituido por dos especies: *S. maltophilia* y *S. africana* aislada de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente infectado por VIH con meningoencefalitis (Juliet L & Fernández V, 2006).

“*Stenotrophomonas maltophilia* es un bacilo Gram negativo no fermentador con elevada importancia como agente nosocomial. Originalmente descrito como un microorganismo colonizador de limitado poder patogénico. Considerado en los

últimos años como un verdadero patógeno asociado a una significativa morbilidad” (Senol, 2004, p. 1). “Es un bacilo de distribución universal aislado del suelo, el agua, los vegetales y los animales, así como en diferentes ambientes hospitalarios” (Corzo-Delgado & Gómez-Mateos, 2006, p. 1).

La actividad antibacteriana de *Stenotrophomonas maltophilia* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas se ha demostrado en pocos estudios. Uno de ellos es el descrito por Dong, Zhu, Chen, Ye, & Huang (2015), al concluir que Endolysin P28 una enzima codificada por fagos al final de su ciclo de replicación, es útil para degradar el peptidoglicano de la pared de la célula huésped es decir que fue capaz de lisar todas las bacterias Gram positivas ensayadas y exhibió alta actividad lítica contra tres bacterias Gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *Pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas citri* ssp. *malvacearum*.

1.2. Los Antibióticos

“Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Son metabolitos secundarios típicos, la mayoría de los antibióticos que se utilizan en medicina son producidos por hongos filamentosos o por bacterias” (Madigan, 2009, p. 818).

Otros autores resaltan que:

Estas moléculas de origen natural manifiestan a bajas concentraciones actividades biológicas de naturaleza principalmente antibacteriana, antifúngica, anticancerosa, antiviral o antiparasitaria, si bien son conocidos por sus aplicaciones médicas, presentan también un interés significativo en los campos de la sanidad animal y de cría es decir en la agricultura e inclusive

debido su éxito en la terapéutica ha llevado a ensayarlos en el campo fitosanitario (Leveau et al., 2000, pp. 458-462).

Según indica Seija & Vignoli (2012), los antibióticos se encuentran constituidos por un heterogéneo grupo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, los cuales ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo además de tener un elevado potencial biológico para actuar a bajas concentraciones y toxicidad selectiva, presentando en la mayor parte de casos analizados, mínima toxicidad para las células de nuestro organismo.

De acuerdo a la interacción germen-antibiótico, estos fármacos pueden dividirse en:

- a) Bactericidas: Su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.
- b) Bacteriostáticos: A las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo (Seija & Vignoli, 2012, p. 631).

1.2.1. Principales grupos de fármacos antimicrobianos

En la tabla 2 se indica la clasificación de los principales grupos de antibióticos.

Tabla 2. Clasificación de los principales grupos de fármacos antimicrobianos.

Principales grupos de fármacos antimicrobianos	
1. Aminoglucósidos	Estreptomicina, Neomicina, Amikacina, Kanamicina, Tobramicina, Gentamicina, Espectinomicina.

2. Betalactámicos	
Penicilinas:	Bencilpenicilinas: Bencilpenicilina (Penicilina G), Fenoximetilpenicilina (Penicilina V).
	Carboxipenicilinas: Ticarcilina.
	Isoxazolilpenicilinas: Cloxacilina.
	Aminopenicilinas: Amoxicilina, Ampicilina, Bacampicilina.
	Ureidopenicilinas: Piperacilina.
Cefalosporinas:	1ª generación: Cefadroxilo, Cefalexina, Cefradina, Cefalotina, Cefazolina.
	2ª generación: Cefaclor, Cefuroxima Axetilo, Cefprozilo, Cefonicida, Cefoxitina, Cefuroxima, Cefminox.
	3ª generación: Cefixima, Cefpodoxima proxetilo, Ceftibuteno, Cefditoreno, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona.
	4ª generación: Cefepima, Cefpiroma.
Monobactamas:	Aztreonam.
Carbapenemes:	Imipenem, Meropenem, Ertapenem.
Inhibidores de beta-lactamasas:	Amoxicilina y Ácido clavulánico, Ampicilina y Sulbactam, Piperacilina y Tazobactam.
3. Anfenicoles	Cloranfenicol.
4. Glicopéptidos	Vancomicina, Teicoplanina.
5. Lincosamidas	Clindamicina, Lincomicina.
6. Macrólidos	Eritromicina, Espiramicina, Josamicina, Midecamicina, Roxitromicina, Azitromicina, Claritromicina, Telitromicina.
7. Quinolonas	Ciprofloxacino, Ofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Norfloxacino.
8. Sulfamidas	Trimetoprima, Cotrimoxazol.
9. Tetraciclinas	Doxiciclina, Minociclina, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Tigeciclina.
10. Miscelánea	Mupirocina, Fosfomicina, Ácido fusídico, Polimixinas, Bacitracina, Gramicidina, Tirotricina, Retapamulina.

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

1.2.2. Aislamiento y Caracterización

De los productos de origen microbiano que se fabrican comercialmente, probablemente los antibióticos son los más importantes. Aquellos que se usan comercialmente son producidos inicialmente por hongos filamentosos y por bacterias del grupo de los actinomicetos. En la tabla 3 se indica una lista de los antibióticos más importantes producidos por fermentación a gran escala.

Tabla 3. Algunos antibióticos producidos comercialmente.

Antibiótico	Microorganismo productor
Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i> (EFB)
Cefalosporina	<i>Cephalosporium</i> sp. (F)
Cloranfenicol	Síntesis química (antiguamente producida microbiológicamente por <i>Streptomyces venezuelae</i>) (A)
Cicloheximida	<i>Streptomyces griseus</i> (A)
Cicloserina	<i>Streptomyces orchidaceus</i> (A)
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i> (A)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i> (F)
Kanamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> (A)
Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i> (A)
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i> (A)
Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i> (A)
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i> (F)
Polimixina B	<i>Bacillus polymyxa</i> (EFB)
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i> (A)
Tetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i> (A)

Nota: Tomado de Brock *Biología de los Microorganismos* (Madigan, 2009, p. 818).

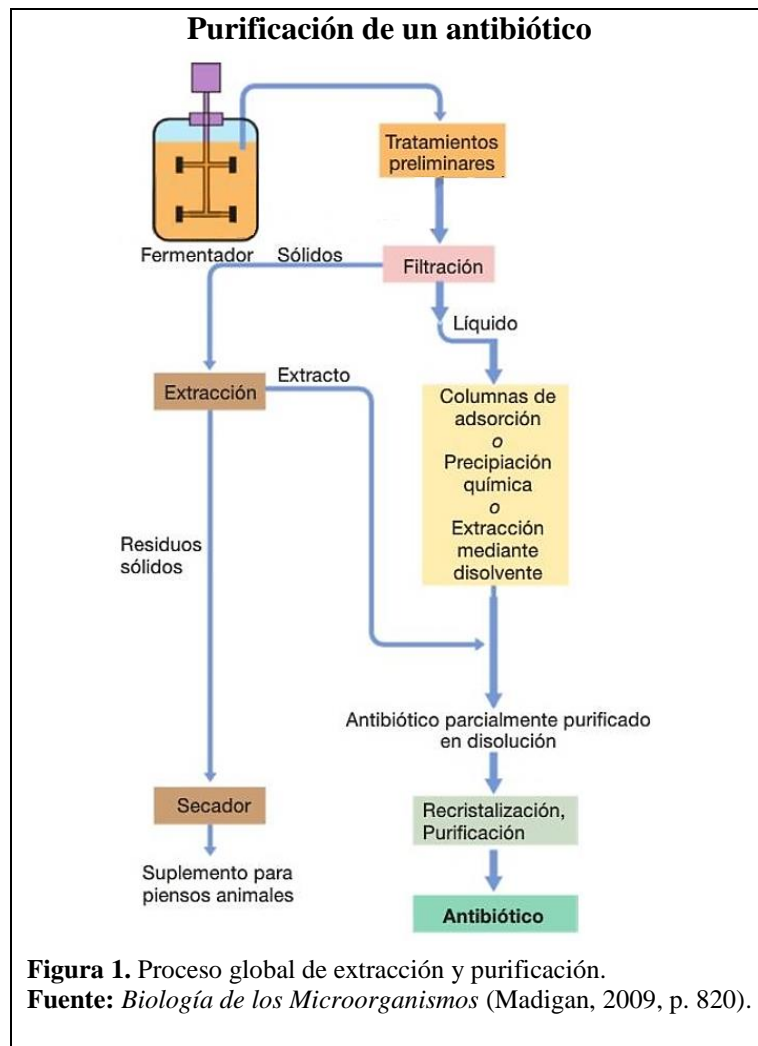
EFB: bacteria formadora de endosporas; **F:** hongo; **A:** actinomiceto

La manera tradicional de descubrir nuevos antibióticos se basa en programas de selección en el laboratorio. Posteriormente, se ensaya la producción de antibióticos en estos aislamientos, comprobando si los microorganismos producen sustancias antimicrobianas. Aquellos aislamientos que sean candidatos en la producción de antibióticos se estudiarán posteriormente para determinar si los compuestos que producen son nuevos o no. Cuando se

descubre un microorganismo productor de un nuevo antibiótico, dicho antibiótico se produce en cantidades suficientes para proceder al análisis de su estructura, y determinar posteriormente su toxicidad y su actividad terapéutica. (Madigan, 2009, pp. 818-820).

1.2.3. Purificación de los antibióticos

Para purificar inicialmente el antibiótico una vez producido en fermentadores se debe utilizar métodos de extracción y purificación que generalmente suelen ser complejos. Según indica Madigan (2009), si el antibiótico es soluble en un solvente orgánico la purificación no puede tener complicaciones y puede ser relativamente sencillo purificarlo por extracción en un volumen pequeño de solvente. Sin embargo, si el antibiótico no es soluble en el solvente orgánico, deberá separarse del medio líquido de fermentación por otros métodos como intercambio iónico, adsorción o precipitación química con el objetivo de conseguir un producto cristalino de alta pureza. Dependiendo del proceso pueden ser necesarias más etapas de purificación para eliminar otros productos no deseados que podrían encontrarse en la mezcla antibiótica. En la figura 1 se representa un diagrama del proceso de extracción y purificación.



1.3. Separación analítica

“Las separaciones de sustancias químicas son procesos sumamente importantes, en síntesis, química industrial, ciencias biomédicas y análisis químicos. En el cual se aísla el analito de los potenciales interferentes que ocasionan errores sistemáticos en un análisis, aumentando o atenuando la señal analítica” (Skoog, West, et al., 2008, p. 917).

Según Harvey & Ruizalvar (2002), el objetivo de la separación analítica consiste fundamentalmente en extraer el analito o el interferente separándolos de la matriz. Para que esto sea posible, ha de haber al menos una diferencia significativa entre las propiedades químicas o físicas del analito y el interferente.

Regularmente en la industria es necesario separar los componentes de una mezcla en fracciones individuales las cuales se diferencian entre sí por el tamaño de las partículas, por su estado, o por su composición química. Por lo que se ha desarrollado un gran número de métodos para realizar tales separaciones analíticas (Foust, Wenzel, Clump, Maus, & Andersen, 2006).

En la tabla 4 se muestra varios métodos de separación que son de uso común.

Tabla 4. Métodos de separación.

Método	Base del Método
Separación mecánica de la fase Precipitación y filtración Destilación Extracción Intercambio iónico	Diferencia de solubilidad de los compuestos formados Diferencia en la volatilidad de los compuestos Diferencia de solubilidad en dos líquidos inmiscibles Diferencia en la interacción de los reactivos con una resina de intercambio iónico.
Cromatografía	Diferencia en la velocidad del movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria
Electroforesis	Diferencia en la velocidad de migración de especies cargadas de un campo eléctrico
Fraccionamiento campo-flujo	Diferencia en la interacción con un campo o gradiente aplicado perpendicularmente a la dirección del transporte

Nota: Adaptado de *Fundamentos de química analítica* (Skoog, West, et al., 2008, p. 919).

1.4. Separación de analitos presentes en mezclas líquidas

La separación de los componentes presentes en mezclas líquidas se basa principalmente en la “transferencia de material desde una fase homogénea a otra donde se utiliza diferencias de presión de vapor o de solubilidad” (McCabe, Smith, & Harriott, 2007, p. 808).

Dos sustancias son separables solo si muestran diferencias significativas en sus propiedades tales como su tamaño, densidad, presión de vapor, solubilidad o velocidad de reacción. Se considera que este tipo de separación en mezclas líquidas implica la formación de dos fases y la transferencia de materia de una fase a la otra. Una fase contiene la sustancia de interés y la otra la interferencia. Las dos fases se separan mecánicamente y, normalmente, se retiene la que contiene la sustancia de interés (Laitinen & Harris, 1992, pp. 435-436).

La existencia de dos fases es indispensable para originar el proceso separativo. Generalmente, la fase que contiene a la muestra se denomina fase inicial mientras que la segunda fase puede originarse de dos maneras:

- a) Directamente, mediante la provocación “in situ” de un fenómeno físico o químico que crea una segunda fase en la ya existente.
- b) Indirectamente, mediante el uso de una fase externa al sistema inicial, que se incorpora al mismo (un líquido inmiscible: extracción, un sólido: cromatografía, cambio iónico) (Cases & Hens, 1988, p. 8).

En la tabla 5 se indica una clasificación de los procesos de separación según el criterio estático del origen de la segunda fase.

Tabla 5. Clasificación de las técnicas de separación según el origen de la segunda fase.

Segunda fase formada “In situ”	Segunda fase añadida
Precipitación Destilación Electrodeposición Fusión por zonas Fraccionamiento espumante	Extracción Cromatografía Cambio iónico Electroforesis Diálisis

Nota: Tomado de *Técnicas analíticas de separación* (Cases & Hens, 1988, p. 8).

1.4.1. Separación por Extracción

La extracción es, posiblemente, la técnica más utilizada para separar un compuesto orgánico de una mezcla. Se distinguen dos procesos: la extracción sólido-líquido y la extracción líquido-líquido

a) Extracción (sólido – líquido)

Tiene por objeto la separación de un componente de una muestra sólida con un disolvente, normalmente orgánico, en el cual los demás componentes son insolubles. Se trata, pues, de una disolución selectiva.

El procedimiento más simple de extraer una sustancia a temperatura ambiente consiste en tener en contacto la muestra pulverizada con el disolvente, durante cierto tiempo, y facilitando el equilibrio sólido-líquido mediante agitación (Solano Oria, Pérez Pardo, & Tomas Alonso, 1992, p. 35).

b) Extracción (líquido – líquido)

A menudo llamada extracción con disolventes, el cual consiste en la separación de los constituyentes de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible (parcial o totalmente inmiscible), por lo tanto, no supone cambio de estado físico. Si los componentes de la mezcla original se distribuyen de forma diferenciada entre las dos fases líquidas, se produce un cierto grado de separación, que puede acentuarse por la combinación de etapas múltiples, es decir la implementación de diferentes configuraciones de mezclado a múltiples etapas o regímenes de flujo. De esta forma se incrementa el beneficio en operaciones del tipo flujo cruzado, contracorriente y contracorriente con reflujo, tal como ocurre en operaciones como la destilación o la absorción (Marcilla, 1999, p. 11).

Esta técnica de separación se basa en las diferentes polaridades que poseen los componentes de una mezcla líquida, el uso de dos disolventes distintos que no son solubles entre sí y la distribución o reparto de la muestra entre las dos fases inmiscibles. Los componentes de la mezcla se distribuirán de diferente manera en ambos solventes cuando se ponen en contacto. Es un procedimiento utilizado en la mayor parte de casos para aislar sustancias de sus fuentes naturales o de una mezcla determinada (Robles & Esparza, 2014, p. 10).

Según Harvey & Ruizalvar (2002), este tipo de extracciones suelen hacerse con un embudo de separación. Los dos líquidos se colocan en el embudo y se agitan para aumentar la superficie de contacto entre las dos fases. Una vez completada la extracción, se deja que los líquidos se separen, de forma que el de mayor densidad se deposite en la parte inferior del embudo como se indica en la figura 2. Obteniendo una mayor concentración de la sustancia extraída en la primera adición del solvente que se vierte al embudo de separación.



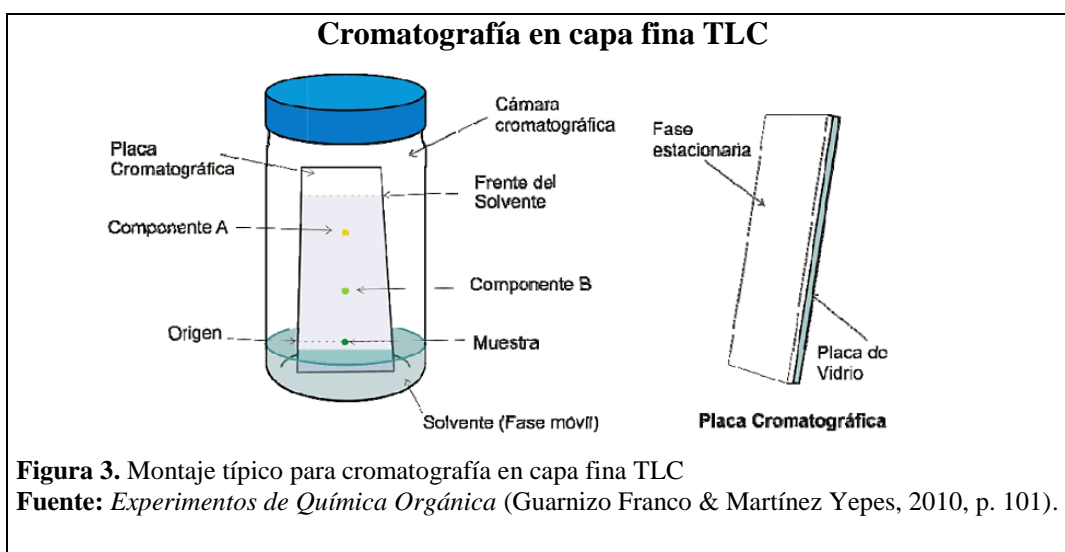
1.4.2. Separación por Cromatografía

La cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla se separan a partir de las diferencias de velocidad a la que son transportadas a través de una fase fija o estacionaria por una fase móvil gaseosa o líquida que se mueve sobre la fase estacionaria o a través de ella, arrastrando consigo la mezcla de analitos (Harvey & Ruizalvar, 2002, p. 931).

1.4.2.1. Separación por Cromatografía en capa fina TLC

La técnica de separación por Cromatografía en capa fina o TLC (Corresponde a las siglas en Ingles de Thin-Layer Chromatography) consta de un sistema de dos fases, una sólida (fase estacionaria) que se aplica en forma de capa delgada, absorbente, generalmente de entre 0,10 a 0,25 mm de espesor para fines analíticos y en los casos en que se quiere aislar un compuesto el espesor de la placa puede variar entre 0,5 y 2,0 mm. Esta capa delgada se puede encontrar fija a una placa de vidrio, aluminio o plástico que sirve como soporte. A través de la fase estacionaria circula un líquido o solvente denominado fase móvil o eluyente (Guarnizo Franco & Martínez Yepes, 2010).

En la figura 3 se muestra un típico montaje de una cromatografía en TLC.



1.4.2.2. Adsorbentes y eluyente



Los adsorbentes o fase estacionaria más utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. El proceso de adsorción a la placa de cromatografía se debe a interacciones intermoleculares del tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente pudiendo ser un disolvente único o dos disolventes de diferente polaridad (Rouessac, Rouessac, & Rodríguez, 2003).

El poder eluotrópico o poder de elución de los disolventes orgánicos comúnmente usados en cromatografía sigue el siguiente orden descendente.

Poder eluyente: Ácido acético > agua > alcohol etílico > acetona > acetato de etilo > dietiléter > diclorometano > cloroformo > tolueno > benceno > tetracloruro de carbono > hexano > pentano (Durst & Gokel, 1985).

En la tabla 6 se muestra el orden de elución y la polaridad de varios grupos funcionales de los solventes usados como fase móvil.

Tabla 6. Polaridad y orden de elución de disolventes orgánicos.

Polaridad	Orden de elución	Tipo de compuesto
Menor  Mayor	Menor retención  Mayor retención	Alcanos, alquenos Éteres Derivados halogenados Aldehídos y cetonas Esteres Aminas Alcoholes Fenoles Ácidos carboxílicos

Nota: Adaptado de *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales* (Rouessac et al., 2003).

1.4.2.3. Determinación del factor de retención (R_f)

“El método usual para determinar el movimiento relativo de un compuesto consiste en comparar la distancia recorrida por la muestra con la distancia recorrida por la fase móvil. Esta relación se denomina factor de retención (R_f por sus siglas en inglés)” (Durst & Gokel, 1985, p. 90).

Este tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a 0,3 y 0,5 y se lo puede calcular mediante la siguiente expresión:

R_f = distancia recorrida por el compuesto / distancia recorrida por el eluyente (Alonso, Ruiz, Quintanilla, & Zarcero, 2009).

1.4.2.4. Revelado de placas

La mayor parte de las placas llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm) este indicador absorbe luz ultravioleta y emite luz visible, la presencia de un compuesto activo en el ultravioleta evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se halla el producto y como resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto, si la muestra o mancha no es coloreada, se requiere de métodos que permiten visualizar el o los componentes presentes mediante el revelado por métodos químicos como la inmersión o rociado de agentes reveladores que reaccionan con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados (Ocampo, 2008).

1.5. Actividad Antimicrobiana

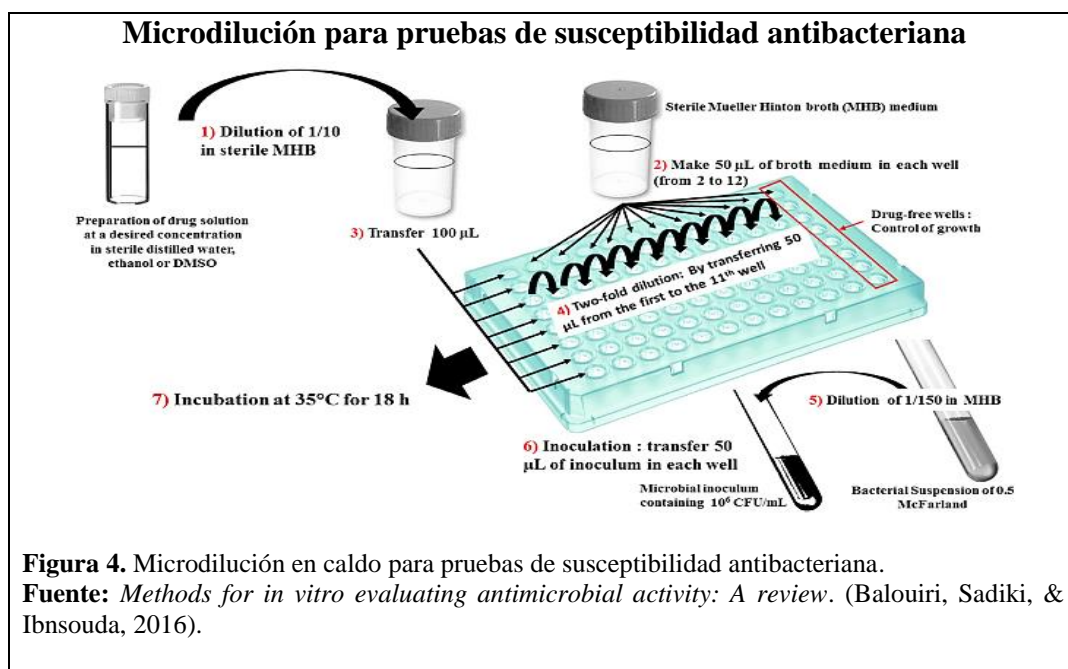
Según indica Sánchez García, Castillo Hernández, & García Palencia (2016), dentro de los principales métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina de manera cualitativa el efecto antimicrobiano de sustancias sobre microorganismos de interés además de contar con pruebas estandarizadas *in vitro* conocidas como bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana ideales para la búsqueda de actividad biológica de compuestos obtenidos de fuentes naturales.

Sin embargo, los métodos de dilución son ideales para determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana siendo la más utilizada la concentración mínima inhibitoria (CMI) definiendo la concentración capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010).

1.5.1. Método de microdilución en caldo

La microdilución en caldo es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos y es el más apropiado para la determinación de los valores (CMI). El procedimiento implica la preparación de diluciones dobles del agente antimicrobiano (por ejemplo, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$) en un medio de cultivo líquido dispensado en una placa de 96 pocillos. Luego, en cada pocillo se inocula el microorganismo de prueba preparado en solución salina estéril y ajustado a una concentración de $(1-2) \times 10^8$ UFC/mL para bacterias o $(1-5) \times 10^6$ UFC/mL para hongos mediante el uso de un espectrofotómetro UV. Después de mezclar bien los pocillos inoculados se realiza la microdilución y se incuba en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba (Balouiri et al., 2016).

En la figura 4 se muestra la microdilución en caldo para pruebas de sensibilidad antibacteriana.

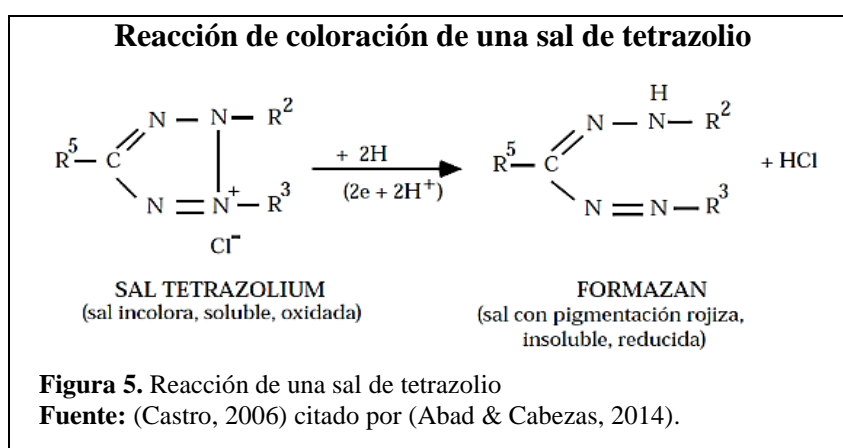


1.5.2. Bioautografía

“La bioautografía es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina (TLC) y la detección de actividad antimicrobiana, logrando visualizar directamente la fracción o fracciones con actividad antimicrobiana” (Colorado R., Galeano J., & Martínez M., 2007, p. 67).

Como indica Troncoso et al. (2015), esta técnica permite detectar la actividad antimicrobiana que resulta compleja de observar con ensayos tradicionales, posee un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos a partir de extractos crudos, utiliza poca cantidad de muestra mostrando ser un ensayo práctico, fácil de realizar y sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica.

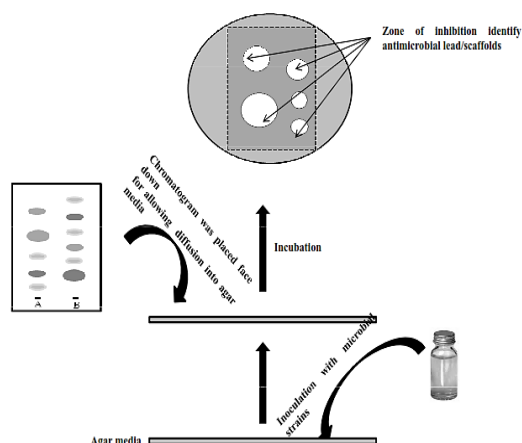
Las zonas de inhibición se visualizan después de un periodo de incubación con la adición de reactivos detectores de la actividad deshidrogenasa, siendo la más usada las sales de tetrazolio como método alternativo para medir la actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones. Como se indica en la figura 5 la reducción de esta sal provoca la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa conocido como formazán (Abad & Cabezas, 2014).



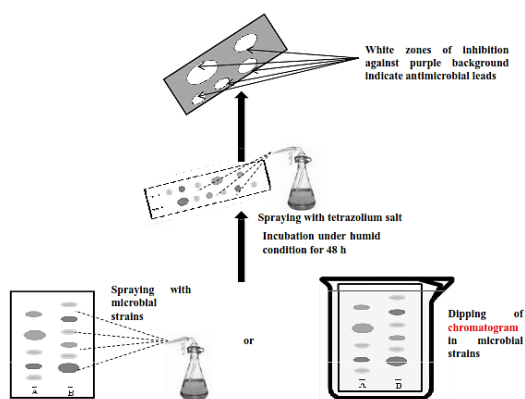
Como se indica en la figura 6 los métodos bioautográficos son divididos principalmente en tres categorías:

- a) Bioautografía por contacto
- b) Bioautografía directa
- c) Bioautografía por inmersión o por superposición de agar (Dewanjee et al., 2015).

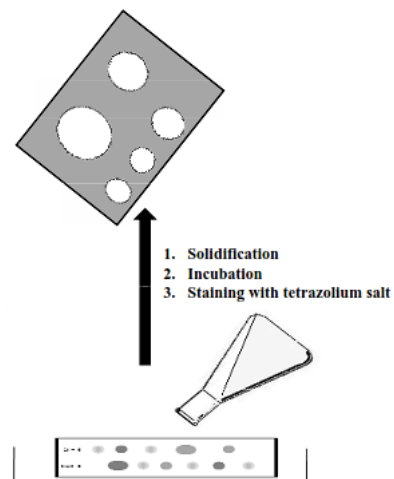
Métodos Bioautográficos



a) Diagrama esquemático de la bioautografía de contacto.



b) Diagrama esquemático de la bioautografía directa.



c) Diagrama esquemático de la bioautografía de inmersión en agar.

Figura 6. Tipos de Bioautografía.

Fuente: Journal of Pharmaceutical Analysis (Dewanjee, Gangopadhyay, Bhattacharya, Khanra, & Dua, 2015, pp. 75-84).

1.6. Técnicas Espectroscópicas de Análisis

La espectroscopía es un término general para la ciencia que trata con las interacciones de varios tipos de radiación con la materia, es decir miden la cantidad de radiación producida o absorbida por especies atómicas o moleculares analizadas (Skoog, Crouch, Holler, & Anzures, 2008, p. 132).

Estos métodos también se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que se utiliza para hacer la medición. Estas regiones incluyen

los rayos gamma, rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y radiofrecuencias. Además de la radiación electromagnética, la espectroscopia también incluye técnicas de espectroscopia acústica, de masa y electrónica (Skoog, 2001, p. 567).

1.6.1. Espectroscopia de absorción infrarroja (IR)

La espectroscopia de absorción infrarroja es una de las técnicas que se emplean en la química analítica. La absorción de radiación en la región del IR puede generar información acerca de la naturaleza de los compuestos, de la existencia o no de grupos funcionales y de la estructura de las moléculas. La absorción IR entre otros métodos es una de las técnicas fundamentales en el análisis cualitativo y muy valiosa para identificar grupos funcionales presentes en muestras desconocidas (Skoog, 2001, p. 631).

La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende desde el extremo rojo al final del espectro visible, hasta las microondas; es decir esta región incluye radiaciones de longitudes de onda entre 0,7 y 500 μm o, en números de onda, entre 14000 cm^{-1} y 20 cm^{-1} (Willard, Hernández, & Bocanegra, 1991, p. 207).

La espectroscopia infrarroja implica movimientos de torsión, flexión, rotación y vibración de los átomos de una molécula es decir genera un cambio de su configuración mostrando en el espectro una especie de huella dactilar única que se puede distinguir de los espectros de absorción de otros compuestos (Skoog, 2001).

En la figura 7 se indican las regiones del espectro que se utilizan en espectroscopia analítica y las transiciones atómicas o moleculares responsables de la absorción o emisión de radiación en cada región.

Regiones del espectro electromagnético

Tipo de cambio cuántico	Cambio de espín		Cambio de orientación	Cambio de configuración	Cambio de configuración electrónica		Cambio de configuración nuclear
	10^{-8}	1	100	10^4	10^6	10^8	Número de onda, cm^{-1}
10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm	10 nm	100 pm	Longitud de onda
3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	3×10^{18}	Frecuencia, Hz
10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	10^9	Energía, J/mol
Tipo de espectroscopía	RMN	ESR	Microondas	Infrarrojo	Visible y ultravioleta	Rayos X	Rayos γ

Figura 7. Regiones del espectro electromagnético utilizados en espectroscopia analítica.

Fuente: *Fundamentos de química analítica* (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2008).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1. Etapa 1: Reactivación de las cepas microbianas seleccionadas

Se reactivaron diferentes cepas, aisladas de muestras de suelos de cultivo de varias provincias del Ecuador (Pichincha, Galápagos y Tungurahua), identificadas como *Burkholderia cepacia* (PAG C007), *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019) por Egas & Tinajero (2016), las cuales fueron mantenidas en perlas de CRYOBANK™ una temperatura de -80 grados Celsius.

A cada cepa seleccionada se le asignó un código, según el siguiente criterio:

Ej.: PAG C001

PA: Proyecto Antibióticos

G: Sigla del lugar de muestreo (Galápagos, Quito, Ambato)

C: Cepa aislada

001: número en orden de aislamiento.

Se sembró mediante estría simple cada una de las cepas sobre medio de cultivo estéril TSA *Tryptic Soy Agar* y se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 horas.

2.2. Etapa 2: Inóculo en biorreactor

2.2.1. Preparación del medio de cultivo ISP2

Se preparó 2000 mL de medio ISP2 según lo descrito por Boubetra et al. (2013), siguiendo la siguiente formula: 8.0 g de extracto de levadura, 20.0 g de extracto de malta y 8.0 g de dextrosa, se llevó hasta ebullición en frascos de vidrio borosilicato de

un litro y se vertió en el biorreactor (BioFlo® / CelliGen™ 115) donde se reguló el pH del caldo a $7,0 \pm 0,2$ y se esterilizó.

2.2.2. Preparación del overnight de las cepas seleccionadas

Se inoculó una unidad formadora de colonia (UFC) de la cepa *Burkholderia cepacia* (PAG C007) en 100 mL de caldo de cultivo ISP2 durante 24 horas a 150 rpm y una temperatura de 30 ± 2 °C en una incubadora con agitación marca (New Brunswick™ Excella® E24), siguiendo lo descrito por Sierra-García et al. (2012), para obtener una concentración cercana a 12×10^8 UFC/mL equivalente a 4 si se toma como referencia la escala de turbidez de McFarland.

Posteriormente se tomó 20 mL de cultivo y se dispensó en el biorreactor (BioFlo® / CelliGen™ 115), que contenía 2000 mL del mismo caldo de cultivo estéril. La incubación fue realizada para la cepa PAG C007 en condiciones anaeróbicas a 150 rpm y una temperatura de $30 \pm 0,2$ °C durante 8 días.

De la misma manera se preparó el inóculo de las demás cepas. Se incubó la cepa (PAQ C024) *Burkholderia cepacia* durante 7 días y la cepa (PAA C019) *Stenotrophomonas maltophilia* durante 9 días tomando en cuenta las mismas condiciones descritas anteriormente. Al cabo de este tiempo se extrajo el metabolito secundario de interés producido por estas cepas.

2.3. Etapa 3: Extracción del antibiótico

Para la extracción de los antibióticos del caldo de cultivo ISP2, se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos para separar la biomasa bacteriana según la metodología de (Muharram & Abdel-Kader, 2014). Posteriormente se recogió el sobrenadante y se almacenó en frascos ámbar de 1000 mL manteniéndolo en refrigeración durante 24 horas.

Transcurrido las 24 horas se realizó la extracción líquido-líquido colocando 400 mL del líquido sobrenadante almacenado dentro de un embudo de separación de 1000 mL de capacidad con la misma cantidad de solvente orgánico “diclorometano”, se agitó adecuadamente para que el solvente extraiga la mayor cantidad de antibiótico y se esperó hasta que la fase orgánica se separe de la fase acuosa. Finalmente se recogió la fase orgánica compuesta por el antibiótico y el diclorometano.

Este proceso se realizó tres veces con la misma fase acuosa contenida en el embudo de separación, añadiendo 200 mL más de diclorometano puro con la finalidad de extraer la totalidad del antibiótico. La fase orgánica se concentró a sequedad y al vacío utilizando un rotavapor marca (IKA® RV 10 basic), a una temperatura de 40 °C. Finalmente se pesó el antibiótico obtenido.

Este procedimiento se realizó para el antibiótico producido por las 3 cepas seleccionadas.

2.4. Etapa 4: Análisis del compuesto extraído

2.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se utilizó la técnica de microdilución en caldo, basándose en la metodología descrita por (Balouiri et al., 2016).

2.4.1.1. Preparación del microorganismo de control

Se preparó en un matraz Erlenmeyer 250 mL de caldo de cultivo TSB estéril en el cual se inoculó 1 mL de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) con una concentración de 0,5 en la escala de turbidez de McFarland y se dejó en incubación a 30 ± 2 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se recogió en tubos tipo Falcón de 50 mL y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos, se eliminó el líquido sobrenadante y se añadió suero fisiológico estéril hasta conseguir una concentración de $1,5 \times 10^8$

UFC/mL. Para esto se utilizó un espectrofotómetro UV marca (Shimadzu UV mini 1240) utilizando entre 0,08 - 0,12 de absorbancia a una longitud de onda de 625 nm.

2.4.1.2. Preparación de la solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Se preparó una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1%, para esto se esterilizó 10 mL de agua destilada la cual una vez fría se agregó 100 mg de TTC se agitó y se almacenó en la nevera hasta su uso.

2.4.1.3. Preparación del antibiótico

Se pesó 100 mg del antibiótico extraído y se disolvió en 1 mL de diclorometano para obtener una solución madre con una concentración de 100 mg/mL. Además, se preparó una solución de gentamicina, antibiótico de amplio espectro en una concentración de 80 mg/mL como control positivo.

2.4.1.4. Microdilución en caldo

Se colocó en todos los pocillos de la fila “A” 192 μ L de medio de cultivo TSB estéril. En los pocillos A1, A2, A3 se colocó 8 μ L de antibiótico producido por la cepa codificada como PAG C007 previamente disuelto en diclorometano; en los pocillos A4, A5, A6 el antibiótico producido por la cepa codificada como PAQ C024 y en los pocillos A7, A8, A9 el antibiótico producido por la cepa codificada como PAA C019 en una concentración de 100 mg/mL. En el pocillo A10 se colocó diclorometano como blanco para comprobar que el solvente no interfiere en el crecimiento normal de los microorganismos, en el pocillo A11 se colocó 8 μ L de antibiótico comercial “Gentamicina” (Control positivo) en una concentración de 80 mg/mL y en el pocillo A12 no se colocó antibiótico (Control negativo), obteniendo en total 200 μ L en toda la fila A. En la tabla 7 se indica el diseño de la placa que se utilizó con las concentraciones de antibióticos.

Desde la fila “B” hasta la fila “H” se colocó en todos los pocillos 100 μ L de medio de cultivo TSB estéril.

Tabla 7. Diseño de la bandeja de microdilución con la concentración de antibiótico usada en mg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	80	-
B	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-	40	-
C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-	20	-
D	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	-	10	-
E	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	-	5	-
F	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	-	2.50	-
G	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	-	1.25	-
H	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	-	0.63	-

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Donde: A1, A2, A3 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAG C007
A4, A5, A6 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAQ C024
A7, A8, A9 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAA C019
A10, A11, A12 contiene diclorometano, gentamicina, medio TSB respectivamente.

Con una micropipeta multicanal se tomó 100 μ L de la fila “A” y se llevó hacia la fila “B”, se mezcló bien y se obtuvo 200 μ L nuevamente. De la misma manera se tomó 100 μ L de la fila “B” y se llevó hacia la fila “C”, así hasta llenar todos los pocillos con 100 μ L eliminando el volumen sobrante de la última fila.

Se tomó 100 μ L de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) previamente preparado y se colocó en todos los pocillos de la placa. Finalmente se incubó a 35 ± 2 °C durante 18 horas en una incubadora con agitación marca (New Brunswick™ Excella® E24).

Transcurrido ese tiempo se colocó 50 μ L de solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1% y se incubó durante 30 minutos hasta observar un cambio en la coloración. Finalmente se llevó la placa al equipo Microplate Reader para su lectura.

2.4.2. Análisis del antibiótico en Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Para la purificación parcial de sustancias antimicrobianas se evaluó el comportamiento de elución de distintos solventes en varias proporciones. Para esto se utilizó varias fases móviles descritas en el Handbook of thin-layer chromatography (Choma, 2013), como se indica en la tabla 8. Además, se consideró la metodología descrita por (Colorado et al., 2007).

Se realizó el ensayo con varias mezclas de solventes orgánicos como fase móvil en diferentes proporciones: Cloroformo - Acetona (2:1) v/v, Cloroformo - Acetona (3:1) v/v y Acetato de etilo - Cloroformo (2:1) v/v, los cuales se vertieron 30 minutos antes del ensayo en una cámara cromatográfica para saturar el ambiente.

Tabla 8. Fases móviles para la cromatografía de antibióticos.

Cromatografía de antibióticos			
Penicilinas			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Penicilina G	Disolver 25 mg de Penicilina en 5 mL de metanol. Aplicar 1µL sobre la placa	tolueno-acetato de etilo-ácido acético (40:40:20)	vapor de iodo - 268nm
Cefalosporinas			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Cefalexina	25 mg de Cefalexina, transferir a un matraz aforado de 5 mL, disolver en Diluyente, completar a volumen con Diluyente y mezclar. Diluyente: Disolver 18 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua. Aplicar 20 µL en placa	acetato de etilo- ácido acético- agua 3:1:1	0,2% de Ninhidrina en etanol
		Buffer–metanol (85:15) Buffer (15% p/v de acetato de amonio, pH 6,2 con ácido acético frio)	0,2% de Ninhidrina en etanol o vapor de iodo
Aminoglucósidos			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Gentamicina	0,65 mg de Gentamicina por 1 mL de agua. Aplicar 20 µL en placa	metanol-cloroformo-solución de amoniaco al 25% (1:1:1)	fluorescamina, vainillina o ninhidrina

Macrólidos			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Eritromicina o Claritromicina	75 mg de Claritromicina, transferir a un matraz aforado de 50 mL, disolver con 25 mL de acetonitrilo, completar el volumen con agua y mezclar. Aplicar 10 µL en placa	metanol-agua-acetato de amonio (5:2:1)	Ácido sulfúrico, anisaldehído, o Reactivo de Dragendorff
Tetraciclinas			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Doxiciclina	Disolver 5 mg de Doxiciclina en metanol y diluir a 10 mL con el mismo solvente. Aplicar 1µL en placa	metanol- acetonitrilo- 0,5 N ácido oxálico con pH 2 (1:1:4)	Piridina
Quinolonas			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Ciprofloxacino	Disolver 10 mg de Ciprofloxacino por mL de ácido acético 0,1 N. Aplicar 5 µL en placa	Impregnado previamente con 0,1 M de K ₂ HPO ₄ o Na ₂ EDTA cloroformo - acetona (9:10)	265nm
Anfenicoles			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Cloranfenicol	Disolver 10 mg de Cloranfenicol por mL de metanol. Aplicar 20 µL en placa	agua-metanol-cloroformo (1:10:90)	254nm
Rifamicinas			
Sustancia	Solvente	Fase móvil	Revelador
Rifampicina	Pesar 200 mg de Rifampicina, transferir a un matraz aforado de 100 mL, disolver en acetonitrilo, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Aplicar 50 µL en placa	hexano- cloroformo- acetona 5:02:01	Ninguna

Nota: Adaptado del *Handbook of thin-layer chromatography* (Choma, 2013).

Para la separación y purificación primaria de compuestos se utilizó placas comerciales de sílica gel marca (Sigma-Aldrich®, L × W 10 cm × 10 cm con factor de fluorescencia a 254 nm) como fase estacionaria. Se aplicó 30 µL del antibiótico extraído previamente disuelto en diclorometano con una concentración de 50 mg/mL sobre una placa TLC. Dispensadas las muestras en la placa se colocó dentro de la cámara cromatográfica previamente saturada con la fase móvil para que el solvente arrastre los componentes de la mezcla antibiótica.

Los compuestos separados se visualizaron en una lámpara UV marca (CAMAG UV Cabinet) con posibilidad de hacer observaciones bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia). Además, se detectó y se calculó el *R_f* (factor de retención) de los compuestos activos, visualizados mediante el uso de un revelador de vainillina. Posteriormente se procedió a calentar la placa sobre una plancha de calor a una temperatura aproximada de 100°C durante 5 minutos para eliminar residuos generados.

2.4.3. Bioautografía o Bioensayo

2.4.3.1. Preparación de la cromatografía

Previo a la realización del ensayo de bioautografía se realizó una separación de la mezcla de los compuestos presentes en el antibiótico extraído. Como indica Choma & Jesionek (2015), la técnica más importante que se utiliza para este propósito es la cromatografía en capa fina TLC.

Para esto se realizó la siembra de cada uno de los antibióticos extraídos producidos por las cepas *Burkholderia cepacia* (PAG C007) *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019) utilizando varios volúmenes 20 µL, 10 µL y 5 µL sobre placas TLC utilizando una concentración de 100 mg/mL de antibiótico

extraído y mediante la fase móvil constituida por Cloroformo - Acetona (2:1) se procedió a eluir las muestras en la cámara cromatográfica.

Los compuestos separados se visualizaron bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y a 365 nm (fluorescencia) para compararlos con placas TLC anteriormente visualizadas.

2.4.3.2. Preparación del microorganismo control

La cepa bacteriana con la que se realizó el bioensayo se obtuvo de la American Type Culture Collection Lab. ATCC® 6633 del microorganismo Gram positivo *Bacillus spizizenii* el cual se reactivó en 100 mL de medio de cultivo TSB estéril y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 30 ± 2 °C con agitación constante en una incubadora con agitación (New Brunswick™ Excella® E24). Una vez obtenido los microorganismos se realizó diluciones hasta obtener una solución 0,5 en la escala de turbidez de McFarland (Grzelak, Majer-Dziedzic, & Choma, 2011).

2.4.3.3. Impregnación de la placa con el microorganismo control

Para esto se consideró la metodología descrita por (Grzelak, Majer-Dziedzic, Choma, & Piorz, 2013).

Se colocó la placa de cromatografía previamente eluida dentro de cajas Petri con la superficie que contiene el antibiótico hacia arriba. Posteriormente se dispensó 25 mL de medio de cultivo Müller Hinton el cual se encontraba a una temperatura aproximada entre los 35 y 40 °C y se añadió 1 mL de tinte TTC al 1% junto con 250 µL de *Bacillus spizizenii* en una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL o 0,5 en la escala de turbidez de McFarland, finalmente se agitó suavemente la caja Petri para que el agar se distribuya uniformemente.

Transcurrido varios minutos, el medio de cultivo solidificó y se lo dejó en un frigorífico a una temperatura de 4 °C durante aproximadamente una hora, con el fin de

promover la transferencia de sustancias depositadas en la placa hacia el agar. Finalmente se incubó la caja Petri durante 24 horas a una temperatura de 30 ± 2 °C.

2.4.3.4. Revelado y medición de los halos de inhibición

Transcurrido 24 horas de incubación se visualizó varias facciones que presentaban inhibición del crecimiento del microorganismo control, se midió el *R_f* (factor de retención) de las facciones antimicrobianas y se midió el halo de inhibición producido en la bioautografía y los halos de inhibición al colocar directamente el antibiótico sobre las placas sin eluir y realizado la bioautografía.

2.4.4. Espectro infrarrojo de los antibióticos obtenidos

Para la obtención de los espectros infrarrojos se siguió la metodología de Baran & Etcheverry (1983), para esto se realizó la técnica de micro pastillas de Bromuro de Potasio (KBr), donde se pesó 100 mg de KBr y se pulverizó en un mortero, colocándolo dentro de una pequeña prensa compactándolo en una pastilla, posteriormente se dispensó sobre la pastilla 20 µL del antibiótico extraído y diluido previamente en diclorometano con una concentración de 50 mg/mL, se esperó unos minutos hasta que el solvente se haya evaporado por completo y finalmente se llevó la pastilla al equipo (Spectrum BX FT-IR), para ser visualizada en el software Spectrum v5.3.1.

Esto se realizó para cada una de las muestras del antibiótico extraído. El ensayo se realizó por triplicado.

Capítulo 3

3. Resultados y Discusión

3.1. De la extracción del antibiótico

Se realizó la extracción del antibiótico producido en el caldo de cultivo ISP2 usando diclorometano como solvente orgánico, debido a que es un solvente comúnmente utilizado en la fabricación de antibióticos por su bajo punto de ebullición de 40 °C, el cual permitió optimizar la extracción, recuperando un porcentaje de solvente sin dañar la sustancia antimicrobiana; se concentró al vacío en un rotavapor llevando la mezcla a baño maría a una temperatura de 40 °C obteniendo el antibiótico en balones de vidrio de 50 mL (Ver anexo 1), con lo cual se logró obtener el peso del antibiótico producido por las bacterias de los géneros *Stenotrophomonas* y *Burkholderia*, así como se indica en la tabla 9.

Como indica Boubetra et al. (2013), al inocular microorganismos generadores de antibióticos en el medio ISP2, el cual fue ideado por el *International Streptomyces Project* (ISP) con el fin de seleccionar procedimientos reproducibles para la caracterización de especies de *Streptomyces*, genera buenos resultados en la producción de antibióticos de origen natural puesto que, produce los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento de bacterias productoras de antibióticos.

Tabla 9. Peso obtenido del antibiótico extraído con diclorometano en medio ISP2.

Cepa Bacteriana	Código	Color	Medio de cultivo en litros	Antibiótico extraído en gramos
<i>Burkholderia cepacia</i>	PAG C007	Ámbar	2	0,1775
<i>Burkholderia cepacia</i>	PAQ C024	Ámbar	2	0,1200
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PAA C019	Ámbar	2	0,0953

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

3.2. Análisis del compuesto extraído

3.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo se presentan en la tabla 10, donde se indica la absorbancia del contenido de cada pocillo de luz UV a una longitud de onda de 625 nm, obteniendo una menor absorbancia en la fila “A”, donde se dispensó 100 mg/mL de antibiótico extraído con excepción de la columna A10 “blanco” (diclorometano en lugar del antibiótico), la columna A11 “control positivo” (Gentamicina) y la columna A12 “control negativo” (sin antibiótico). Ver anexo 2.

Mediante el equipo Microplate Reader se pudo apreciar que hubo una menor absorbancia en los pocillos donde se dispensó 100 mg/mL de antibiótico extraído, en comparación con los pocillos donde se dispensó diclorometano en lugar del antibiótico (blanco) y los pocillos que no tenía ningún antibiótico (control negativo), indicando una moderada actividad antimicrobiana producido por el antibiótico extraído usando esta concentración. Así como indica Acebo-González & Hernández-García (2013), las técnicas turbidimétricas de medición miden la absorbancia de la muestra en estudio. Esta técnica empleada consiste en el uso de un cultivo de microorganismos en un medio líquido, que actúa como una suspensión coloidal, la cual bloquea y refleja la luz que pasa a través de él por lo que la luz es absorbida de manera directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo.

Además, se observó una total inhibición del crecimiento de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) utilizando un antibiótico de amplio espectro como la gentamicina (control positivo) en concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 mg/mL.

Tabla 10. Absorbancias descritas usando el equipo microplate reader mediante la técnica de microdilución.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>1.450</u>	<u>1.381</u>	<u>1.249</u>	<u>1.548</u>	<u>1.630</u>	<u>1.287</u>	<u>1.986</u>	<u>1.936</u>	<u>1.936</u>	2.502	<u>0.209</u>	2.439
B	1.680	2.130	2.336	2.330	2.398	2.565	2.290	2.289	2.396	2.580	<u>0.152</u>	2.487
C	1.992	2.160	2.353	2.403	2.508	2.392	2.232	2.531	2.339	2.406	<u>0.191</u>	2.466
D	2.243	2.243	2.537	2.594	2.680	2.532	2.617	2.647	2.617	2.673	<u>0.141</u>	2.739
E	2.583	2.583	2.334	2.245	2.662	2.418	2.419	2.415	2.455	2.686	<u>0.186</u>	2.796
F	2.288	2.925	2.477	2.552	2.297	2.689	2.749	2.791	2.649	2.868	2.567	2.465
G	2.585	2.178	2.326	2.403	2.458	2.493	2.546	2.567	2.776	2.957	2.418	2.765
H	2.632	2.488	2.567	2.557	2.507	2.384	2.584	2.589	2.625	2.578	2.484	2.808

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Donde: A1, A2, A3 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAG C007
A4, A5, A6 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAQ C024
A7, A8, A9 contiene el antibiótico producido por la cepa codificada como PAA C019
A10, A11, A12 contiene “blanco” diclorometano, “control positivo” gentamicina y “control negativo” medio TSB respectivamente.

3.2.2. Del análisis del antibiótico en Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Para la purificación del antibiótico extraído se utilizó placas comerciales de sílica gel Sigma-Aldrich®, L × W 10 cm × 10 cm con factor de fluorescencia a 254 nm como fase estacionaria y como fase móvil la mezcla constituida por Cloroformo - Acetona (2:1), la cual permitió una mejor separación de las fracciones de la mezcla antimicrobiana (Ver anexo 3), en un tiempo aproximado de 20 minutos. Según Funk et al. (1985) citado por Choma (2013), fases móviles compuestas por varias mezclas de solventes en diferentes proporciones permite realizar una correcta separación de los componentes antimicrobianos comerciales.

Debido a que la placa cromatográfica eluida, no permite observar las fracciones de la mezcla antibiótica bajo luz visible se utilizó un equipo capaz de irradiar luz UV a 254 nm (absorbancia) y a 365 nm (fluorescencia), detectando una correcta separación de varias manchas en la placa TLC que corresponden a analitos fluorescentes que emiten

luz visible bajo luz UV. Según Rouessac et al. (2003), “la localización de compuestos incoloros exige que estos sean revelados para facilitar su visualización, observando como manchas oscuras o coloreadas sobre un fondo fluorescente donde se encuentran los compuestos (siempre que absorban la radiación de excitación)” (p. 100).

Como indica Messaoudi, Bendahou, Benamar, & Abdelwouhid (2015), las sustancias activas se visualiza en placas de TLC de gel de sílice mediante el uso de un revelador de vainillina. Al rociar las placas eluidas con un revelador de vainillina se pudo observar varias manchas rosadas correspondientes a la oxidación de compuestos orgánicos presentes en las muestras analizadas, indicando así la presencia de compuestos activos (Ver anexo 4), con los cuales permitió obtener los R_f de estas sustancias activas, calculando un R_f de 0,45 para el antibiótico producido por la cepa *Burkholderia cepacia* (PAG C007), un R_f de 0,42 para el antibiótico producido por la cepa *Burkholderia cepacia* (PAQ C024) y un R_f de 0,43 para el antibiótico producido por la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019).

3.2.3. Bioautografía o Bioensayo

Se realizó la cromatografía en capa fina “TLC” usando como fase móvil la mezcla constituida por Cloroformo - Acetona (2:1) en tres placas cromatográficas, sembrando sobre cada una de las placas varios volúmenes de antibiótico 5 μ L, 10 μ L y 20 μ L respectivamente con una concentración de 100 mg/mL de antibiótico previo a la realización de la bioautografía, obteniendo una mejor separación de las fracciones con potencial antibacteriano utilizando 20 μ L de antibiótico en esa concentración (Ver anexo 5).

Se calculó los R_f de las fracciones con potencial antibacteriano obteniendo para el antibiótico producido por la cepa *Burkholderia cepacia* (PAG C007) dos R_f ($R_f = 0,59$

y $R_f = 0,44$), de la misma manera para el antibiótico producido por la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* (PAA C019) se obtuvo dos R_f ($R_f = 0,58$ y $R_f = 0,43$) y para el antibiótico producido por la cepa *Burkholderia cepacia* (PAQ C024) se obtuvo un R_f de 0,42 descritos en la tabla 11.

Las sustancias de acción antibiótica y sus derivados se pueden comprobar con procedimientos de test biológico “Bioautografía” siendo su sensibilidad diez veces mayor en comparación con los métodos de comprobación químicos, formándose en el agar zonas de inhibición claras, que indican la situación del antibiótico en el cromatograma y en los sitios libres de antibiótico el agar toma un color rojo parduzco a causa de la reducción de la sal de tetrazolio (Randerath, de los Ríos, & de García de los Ríos, 1970, p. 207).

Tabla 11. Localización de la zona de inhibición de *Bacillus spizizenii* mediante bioautografía.

Muestra C007	Distancia (cm)		Frente (cm)
	1	2	
B. a	4,2	5,6	9,5
B. b	4,2	5,5	9,5
B. c	-	-	9,5
Rf	<u>0,44</u>	<u>0,59</u>	-
Muestra C019	Distancia (cm)		Frente
	1	2	
B. a	4,0	5,4	9,3
B. b	4,0	5,5	9,3
B. c	-	-	9,3
Rf	<u>0,43</u>	<u>0,58</u>	-
Muestra C024	Distancia (cm)		Frente
	1	2	
B. a	4	-	9,5
B. b	4	-	9,5
B. c	-	-	9,5
Rf	<u>0,42</u>	-	-

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Donde: B. a: Banda con 20 μ L de muestra, B. b: Banda con 10 μ L de muestra, B. c: Banda con 5 μ L de muestra, Frente: Frente de eluyente, Rf: factor de retención.

Las medidas de los halos de inhibición luego de la técnica de bioautografía se detallan en la tabla 12. La medida de los halos producidos sin eluir la placa corresponde a 0,8 cm para el antibiótico codificado como (PAG C007), 0,5 cm para el antibiótico codificado como (PAA C019) y 0,9 cm para el antibiótico codificado como (PAQ C024) (Ver anexo 6).

Tabla 12. Medidas de los halos inhibición contra *Bacillus spizizenii* en placas TLC después de la bioautografía.

C 007	Distancia (cm)		C 019	Distancia (cm)		C 024	Distancia (cm)	
	1	2		1	2		1	2
B. a	0,5	0,3	B. a	0,4	0,3	B. a	0,5	-
B. b	0,4	0,2	B. b	0,4	0,2	B. b	0,5	-
B. c	-	-	B. c	-	-	B. c	-	-

Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Donde: B. a: Banda con 20 μ L de muestra, B. b: Banda con 10 μ L de muestra, B. c: Banda con 5 μ L de muestra

3.2.4. Del Espectro Infrarrojo

Al obtener los resultados del espectro infrarrojo de los antibióticos producidos por las cepas codificadas como PAG C007, PAA C019 y PAQ C024, se identificaron los mismos grupos funcionales, como son: Aminas secundarias N-H ($3300-3500\text{ cm}^{-1}$), confirmando en la región de la huella dactilar una banda de flexión fuera del plano N-H ($650-900\text{ cm}^{-1}$) y C-N ($1000-1350\text{ cm}^{-1}$), Alcanos C-H ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), Metilenos C-H₂ ($1450-1485\text{ cm}^{-1}$) y compuestos carbonílicos C=O ($1600-1675\text{ cm}^{-1}$). (Ver anexo 7).

En el antibiótico producido por la cepa codificada como PAG C007 se observan absorciones correspondientes a un éster C=O ($1660-1735\text{ cm}^{-1}$) y C-O ($1000-1300\text{ cm}^{-1}$).

En los antibióticos producidos por las cepas codificadas como PAA C019 y PAQ C024 se observan absorciones correspondientes a un aldehído C=O ($1660-1725\text{ cm}^{-1}$) y C-H ($2650-2850\text{ cm}^{-1}$).

No se observó la presencia de grupos funcionales como alcoholes, alquenos, alquinos, ácidos, nitrilos y compuestos aromáticos.

Como lo menciona Lang, Anaya, Espinosa-García, & Cruz-Ortega (2001), citado por Egas & Tinajero (2016), las características químicas de los antibióticos que son producidos por el metabolismo secundario, deriva del grupo de los aminoácidos, ya que son estos los responsables de la actividad antimicrobiana de algunos antibióticos. Es por eso la importancia de encontrar estos grupos funcionales presentes en antibióticos producidos por el metabolismo secundario de bacterias aisladas del suelo confirmando su actividad antimicrobiana.

Conclusiones

Al producir y realizar la extracción de los antibióticos bajo las condiciones descritas en la metodología, se puede establecer que, el caldo de cultivo utilizado (ISP2), es un medio óptimo para el cultivo de este tipo de bacterias productoras de antibióticos aisladas del suelo, permitiendo obtener sobre los 95 mg de antibiótico a partir de 2 litros de caldo de cultivo.

Se logró detectar una mínima inhibición del crecimiento de *Bacillus spizizenii*, mediante el uso de la técnica in vitro de microdilución en caldo utilizando una concentración conocida de antibiótico extraído, evidenciándose in vitro el efecto antimicrobiano que poseen los antibióticos estudiados. Por lo que, estos antibióticos podrían ser empleados en diversos ensayos de sensibilidad microbiana.

Los antibióticos purificados muestran actividad antibacteriana, al generar varios halos de inhibición sobre las fracciones activas previamente separadas en placas cromatográficas, haciendo uso de la técnica de bioautografía de inmersión en agar, siendo esta técnica un paso previo a la cromatografía preparativa, con la que se podrá aislar las fracciones activas para diferentes análisis instrumentales mucho más detallados.

Se identificaron varios grupos funcionales en común, como aminas secundarias y alcanos, al interpretar los espectros de los antibióticos producidos por las tres cepas analizadas. No se evidenció la presencia de anillos aromáticos, por lo que se presume que la estructura de los antibióticos analizados son cadenas alifáticas, posiblemente con estructuras químicas similares a algunas estructuras de los antibióticos del grupo de los Aminoglucósidos o Tetraciclinas.

Al identificar en los espectros compuestos carbonílicos diferentes como absorciones que corresponden a un éster, probablemente este antibiótico presente una estructura química nueva, como es el caso del antibiótico producido por la cepa codificada como PAG C007, mientras que los antibióticos producidos por las cepas codificadas como PAA C019 y PAQ C024 presentan absorciones correspondientes a un aldehído, siendo este grupo funcional el que posiblemente ejerza un efecto antibacteriano al tener una capacidad para inactivar proteínas.

Recomendaciones

Se sugiere continuar la investigación con estas bacterias productoras de antibióticos y realizar un análisis estadístico para evaluar condiciones de estrés y diferentes medios de cultivo los cuales pueden generar una mayor cantidad de metabolitos secundarios producidos por estas bacterias aisladas del suelo.

Se recomienda al laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana ampliar los cupos de compra de solventes orgánicos como es el diclorometano, ya que es uno de los más utilizados a escala industrial para la producción de antibióticos y que por su bajo punto de ebullición es el ideal para la extracción del antibiótico. Aunque se podría realizar la extracción con otros solventes orgánicos como heptano, hexano, acetato de etilo, etc., corre el riesgo de dañar al antibiótico durante la extracción debido a sus altos puntos de ebullición.

Realizar un análisis estadístico para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los antibióticos que se ha confirmado su actividad antimicrobiana en el Proyecto Antibióticos BIOARN, mediante la técnica de microdilución en caldo. Esto ayudará a tener una noción más clara del potencial antibacteriano de estos antibióticos producidos por bacterias aisladas de suelos del Ecuador.

Realizar una cromatografía preparativa para purificar y aislar la fracción activa del antibiótico extraído para poder realizar un análisis más detallado de su estructura química mediante diferentes técnicas instrumentales y espectroscópicas como por ejemplo la Resonancia Magnética Nuclear o la posibilidad de analizar el antibiótico producido mediante derivatización GC/MS.

Referencias

- Abad, J., & Cabezas, D. (2014). *ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE Piper pubinervulum C. DC PROVENIENTE DE MACAS, ECUADOR.*, Universidad Politécnica Salesiana, Quito - Ecuador.
- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44.
- Alghuthaymi, & Abdullah, M. (2014). Characterization of an antifungal compound produced by *Streptomyces paradoxus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(SPEC. ISS. 1), 77-84.
- Alonso, I. S., Ruiz, S. G., Quintanilla, D. P., & Zarcero, S. M. (2009). Análisis instrumental : algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio europeo de educación superior: Netbiblo.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baran, E. J., & Etcheverry, S. B. (1983). El Espectro Infrarrojo de la Bleomicina. In (Vol. 2, pp. 91). La Plata, Argentina: Acta Farmacéutica Bonaerense.
- Bisacchi, G. S., Hockstein Dr Fau - Koster, W. H., Koster Wh Fau - Parker, W. L., Parker Wl Fau - Rathnum, M. L., Rathnum Ml Fau - Unger, S. E., & Unger, S. E. (1987). Xylocandin: a new complex of antifungal peptides. II. Structural studies and chemical modifications. (0021-8820 (Print)).

- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP*, 19(2), 102-108. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 168(4), 223-230. doi:10.1016/j.micres.2012.11.005
- Cano, M. A. (2011). INTERACCIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN PLANTAS: *Micorrizas*, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. UNA REVISIÓN. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14, 15-31.
- Cartwright, D. K., Chilton, W., & Benson, D. (1995). Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5 B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 211-216.
- Cases, M. V., & Hens, A. G. (1988). *Técnicas analíticas de separación*: Reverté.
- Castro, S. (2006). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE Isertia laevis EMPLEANDO LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.*, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- Choma, I. (2013). Antibiotics. In J. Sherma & B. Fried (Eds.), *Handbook of thin-layer chromatography* (Third Edition ed., Vol. 89, pp. 1282). New York: MARCEL DEKKER, INC.

- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225.
- Cimermancic, P., Medema, Marnix H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, Laura C., Mavrommatis, K., . . . Fischbach, Michael A. (2014). Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters. *Cell*, 158(2), 412-421. doi:10.1016/j.cell.2014.06.034
- Colorado R., J., Galeano J., E., & Martínez M., A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Vitae*, 14, 67-71.
- Corzo-Delgado, J. E., & Gómez-Mateos, J. M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(1), 1-3. doi:10.1157/13083366
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(12), 5215-5229. doi:10.1007/s00253-016-7520-x
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Dong, H., Zhu, C., Chen, J., Ye, X., & Huang, Y.-P. (2015). Antibacterial Activity of *Stenotrophomonas maltophilia* Endolysin P28 against both Gram-positive and

Gram-negative Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1299.
doi:10.3389/fmicb.2015.01299

Durst, H. D., & Gokel, G. W. (1985). *Química orgánica experimental*: Reverté.

Egas, C. I., & Tinajero, M. E. (2016). *AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE PRODUCIR ANTIBIÓTICOS, A PARTIR DE SUELOS DE LAS REGIONES NATURALES DE ECUADOR*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador. Retrieved from
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12142/1/UPS-QT09705.pdf>

el-Banna, N., & Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol*, 85(1), 69-78.

Foust, A. S., Wenzel, L. A., Clump, C. W., Maus, L. L., & Andersen, B. (2006). *Principios de operaciones unitarias* (E. Continental Ed. 2 ed.). México: Compañía Editorial Continental.

Grzelak, E. M., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2011). Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatography test: optimization of growth conditions for gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. *J AOAC Int*, 94(5), 1567-1572.

Grzelak, E. M., Majer-Dziedzic, B., Choma, I. M., & Pilorz, K. M. (2013). Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatography test: optimization of growth conditions for gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*. *J AOAC Int*, 96(2), 386-391.

- Guarnizo Franco, A., & Martínez Yepes, P. N. (2010). *Experimentos de Química Orgánica*: Elizcom S.a.s.
- Harvey, D., & Ruizalvar, S. L. (2002). *Química analítica moderna*: McGraw-Hill.
- Jiao, Y., Yoshihara, T., Ishikuri, S., Uchino, H., & Ichihara, A. (1996). Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Letters*, 37(7), 1039-1042. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02342-9](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039(95)02342-9)
- Juliet L, C., & Fernández V, A. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista chilena de infectología*, 23, 247-248.
- Kirinuki, T., Ichiba, T., & Katayama, K. (1984). General Survey of Action Site of Altericidins on Metabolism of *Alternaria kikuchiana* and *Ustilago maydis* Mode of Action of Altericidins (Part 1). *Journal of Pesticide Science*, 9(4), 601-610. doi:10.1584/jpestics.9.601
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Laitinen, H., & Harris, W. (1992). *Análisis Químico - Texto avanzado de referencia* (McGraw-Hill Ed. 2 ed.). España: Editorial Reverté, S.A.
- Lang, A. L. A., Anaya, A. L., Espinosa-García, F., & Cruz-Ortega, R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*: Plaza y Valdés.

- Leveau, J. Y., García, F. J. C., & Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*: Acribia.
- Madigan, M. T. (2009). *Brock, biología de los microorganismos 12/e*: Pearson Educación.
- Marcilla, A. (1999). *Introducción a las operaciones de separación contacto continuo* (T. docentes Ed. Compobell, S.L. Murcia ed.). Murcia-España: Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriott, P. (2007). *Operaciones unitarias en la ingeniería química*: McGraw-Hill.
- Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D.-E. (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 438-445. doi:<http://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.002>
- Moon, S.-S., Kang, P. M., Park, K. S., & Kim, C. H. (1996). Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry*, 42(2), 365-368. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00897-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00897-7)
- Muharram, M. M., & Abdel-Kader, M. S. (2014). Taxonomic characterization and chemical study of the antifungal constituents of *Streptomyces* sp. KH-F12. *Journal of Biological Sciences*, 14(6), 403-413. doi:10.3923/jbs.2014.403.413
- Ocampo, R. (2008). *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*: Universidad de Caldas.

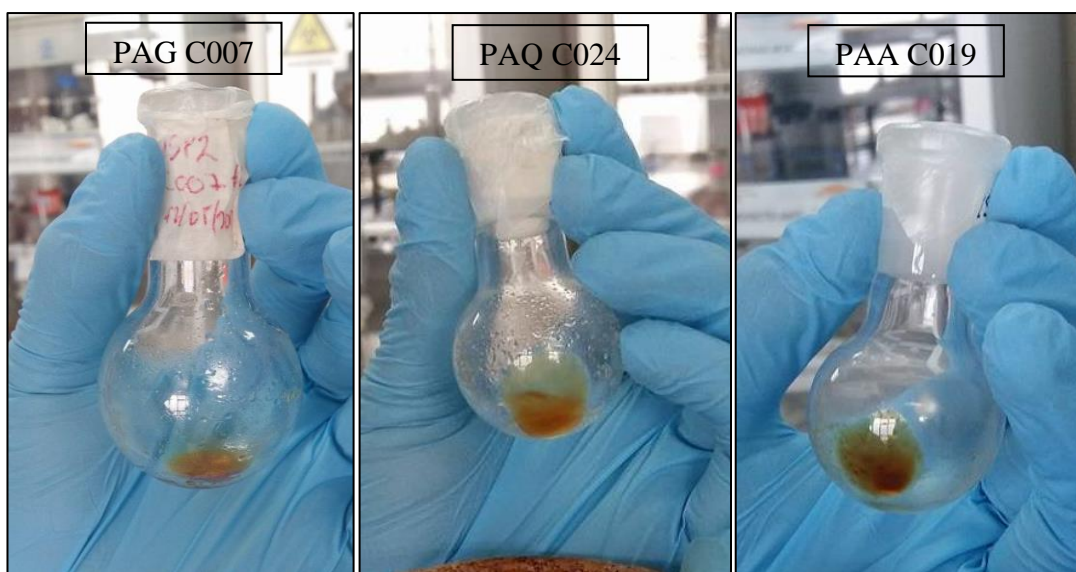
- Parker Wl Fau - Rathnum, M. L., Rathnum Ml Fau - Seiner, V., Seiner V Fau - Trejo, W. H., Trejo Wh Fau - Principe, P. A., Principe Pa Fau - Sykes, R. B., & Sykes, R. B. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. (0021-8820 (Print)).
- Pomilio, A. B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46, 73-82.
- Qin, Z., Munnoch, J. T., Devine, R., Holmes, N. A., Seipke, R. F., Wilkinson, K. A., . . . Hutchings, M. I. (2017). Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African Tetraponera plant-ants. *Chemical Science*, 8(4), 3218-3227. doi:10.1039/C6SC04265A
- Randerath, K., de los Ríos, E. G., & de García de los Ríos, H. (1970). *Cromatografía de capa fina*: Urmo.
- Robles, L. E. R., & Esparza, B. E. R. (2014). *Química experimental: manual de laboratorio* (Primera edición ed. Vol. 1). México: Pearson.
- Rouessac, F., Rouessac, A., & Rodríguez, L. C. (2003). *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas*: McGraw-Hill.
- Schellenberg, B., Bigler L Fau - Dudler, R., & Dudler, R. (2007). Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. (1462-2912 (Print)).

- Seija, V., & Vignoli, R. (2012). Principales grupos de antibióticos. In U. d. l. Republica (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (3 ed., Vol. 2, pp. 631). Montevideo: Instituto de Higiene.
- Senol, E. (2004). *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection*, 57(1), 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.033>
- Sierra-García, I. N., Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actualidades Biológicas*, 34, 5-19.
- Skoog, D. A. (2001). *Química analítica*: McGraw-Hill.
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., Holler, F. J., & Anzures, M. B. (2008). *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*: Cengage Learning.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Fundamentos de química analítica* (Octava Edición ed. Vol. 2). USA: Paraninfo, S.A.
- Solano Oria, E., Pérez Pardo, E., & Tomas Alonso, F. (1992). *Practicas de laboratorio de química orgánica* (Cuarta Edición ed. Vol. 1). Murcia-España: Sucesores de Nogués, S.L.
- Sánchez García, E., Castillo Hernández, S., & García Palencia, P. (2016). *Actividad antimicrobiana*.
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., & Rozo-Núñez, W. (2013). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *2013*, 19(1), 18. doi:10.11144/Javeriana.SC19-1.taci

- Troncoso, N., Saavedra, R., Olivares, A., Farías, J., San-Martín, S., Urrutia, H., & Agurto, C. (2015). Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 50, 199-204.
- Willard, H. H., Hernández, A. R., & Bocanegra, F. P. (1991). *Métodos instrumentales de análisis*: Grupo Editorial Iberoamérica.

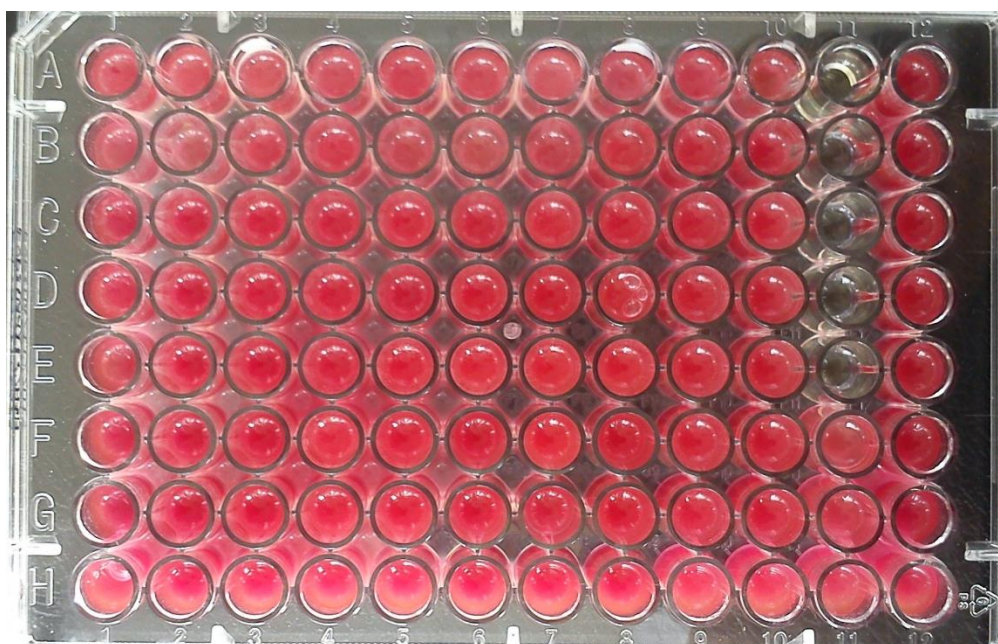
Anexos

Anexo 1. Antibiótico producido por las tres cepas bacterianas extraído con solvente diclorometano y concentrado en rotavapor.



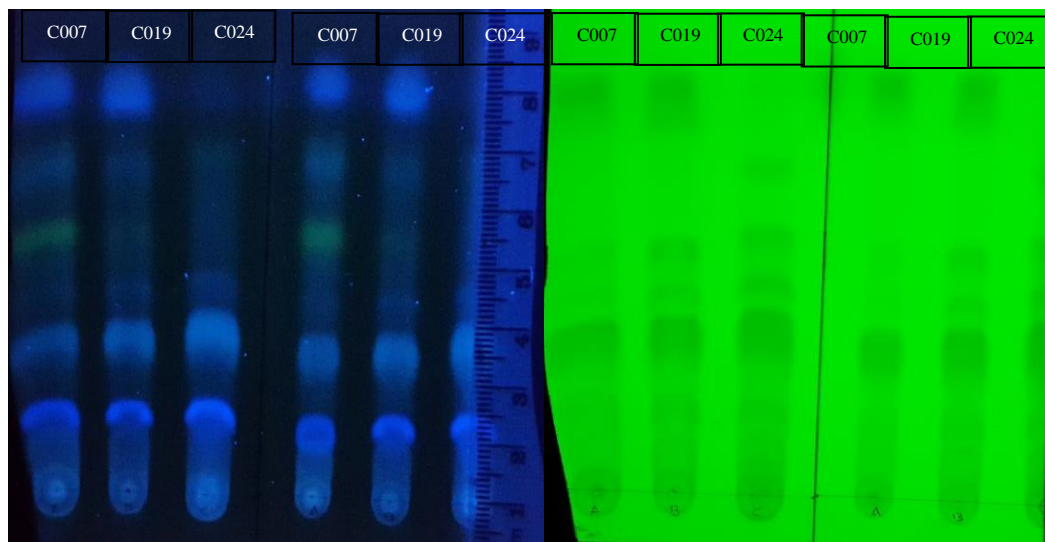
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 2. Placa de microdilución en caldo usada para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).



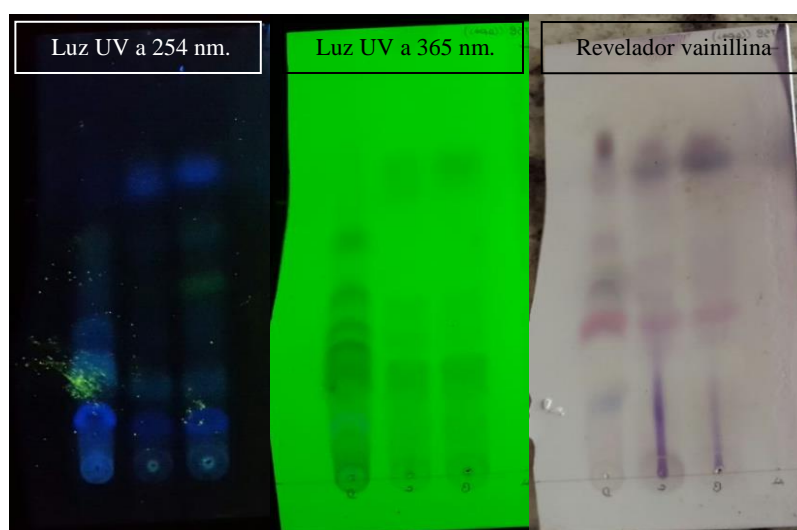
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 3. Cromatografía "TLC" de los antibióticos con una concentración de 50 mg/mL observadas bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y a 365 nm (fluorescencia).



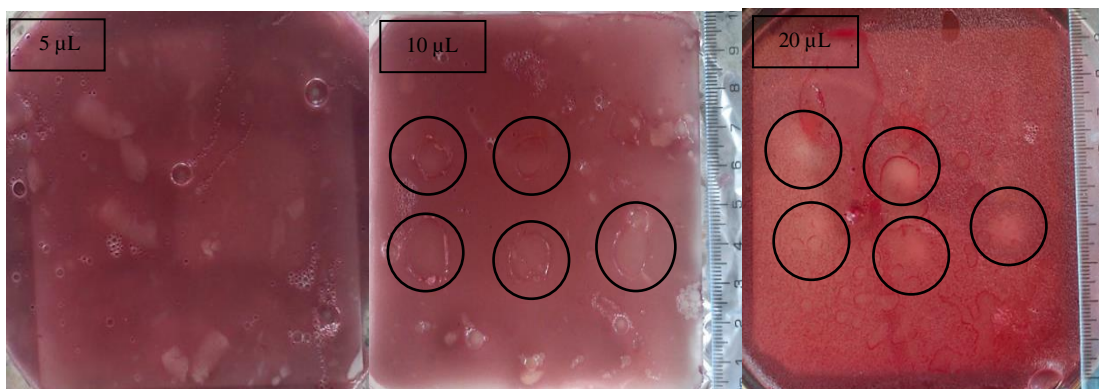
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 4. Cromatografía en capa fina "TLC" revelado con vainillina.



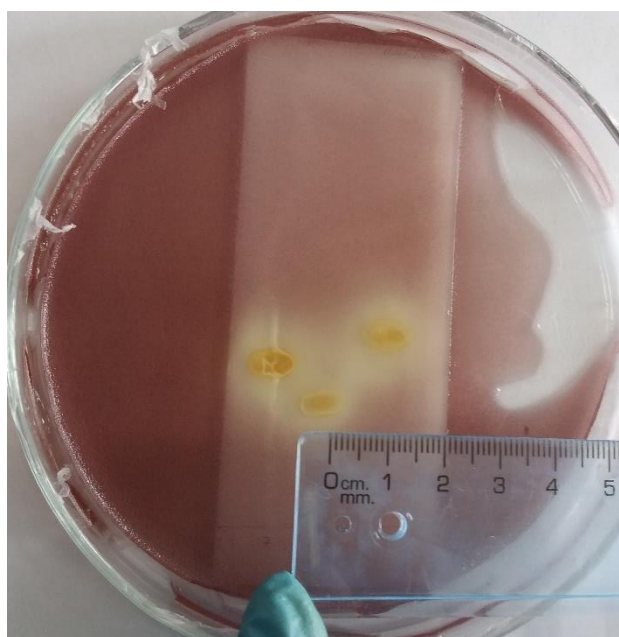
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 5. Bioautografía de antibióticos, muestra con volumen de 5 μ L, 10 μ L y 20 μ L y una concentración de 100 mg/mL.



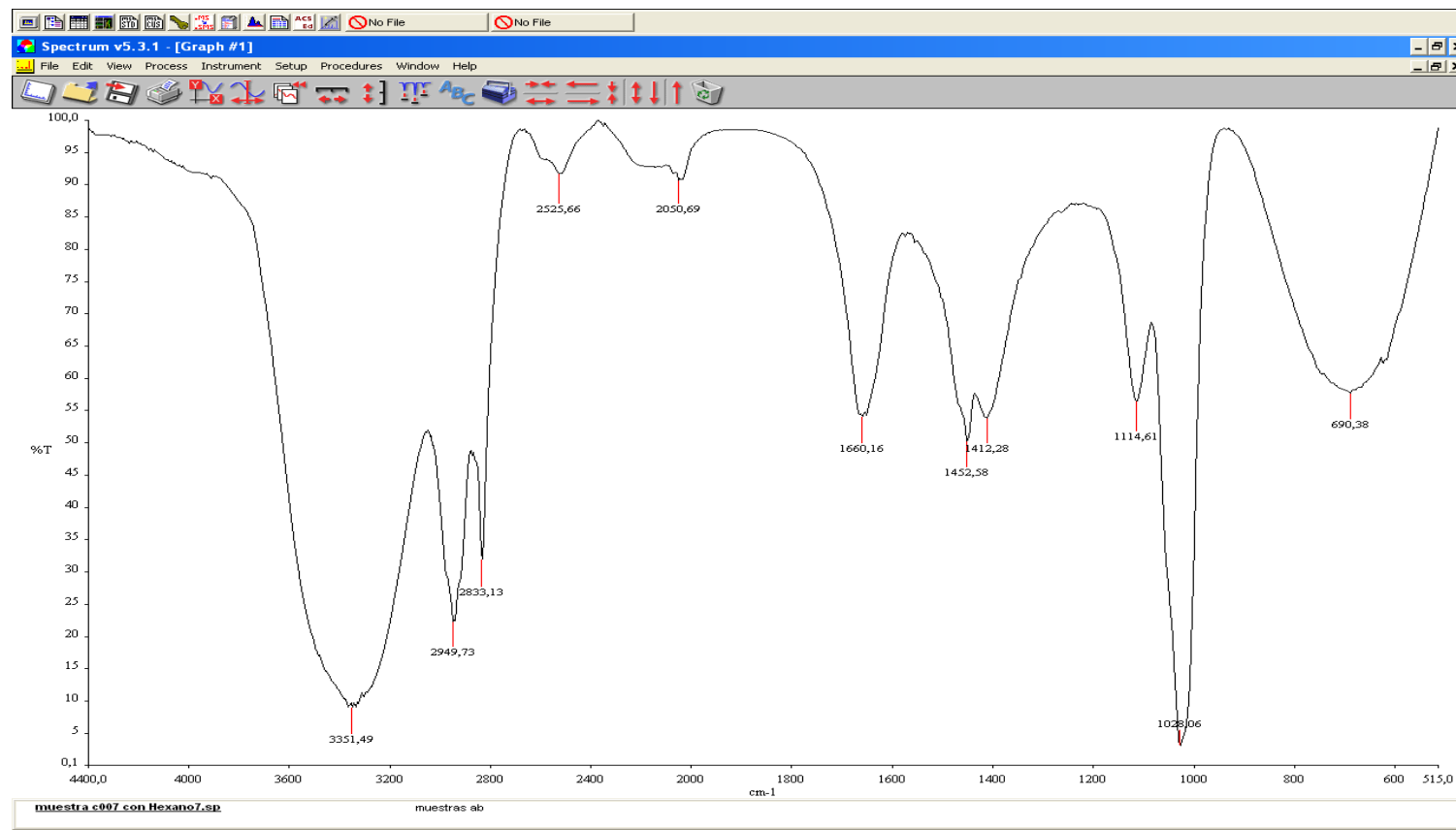
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 6. Halos de inhibición producido por los antibióticos extraídos sin eluir la placa cromatográfica.



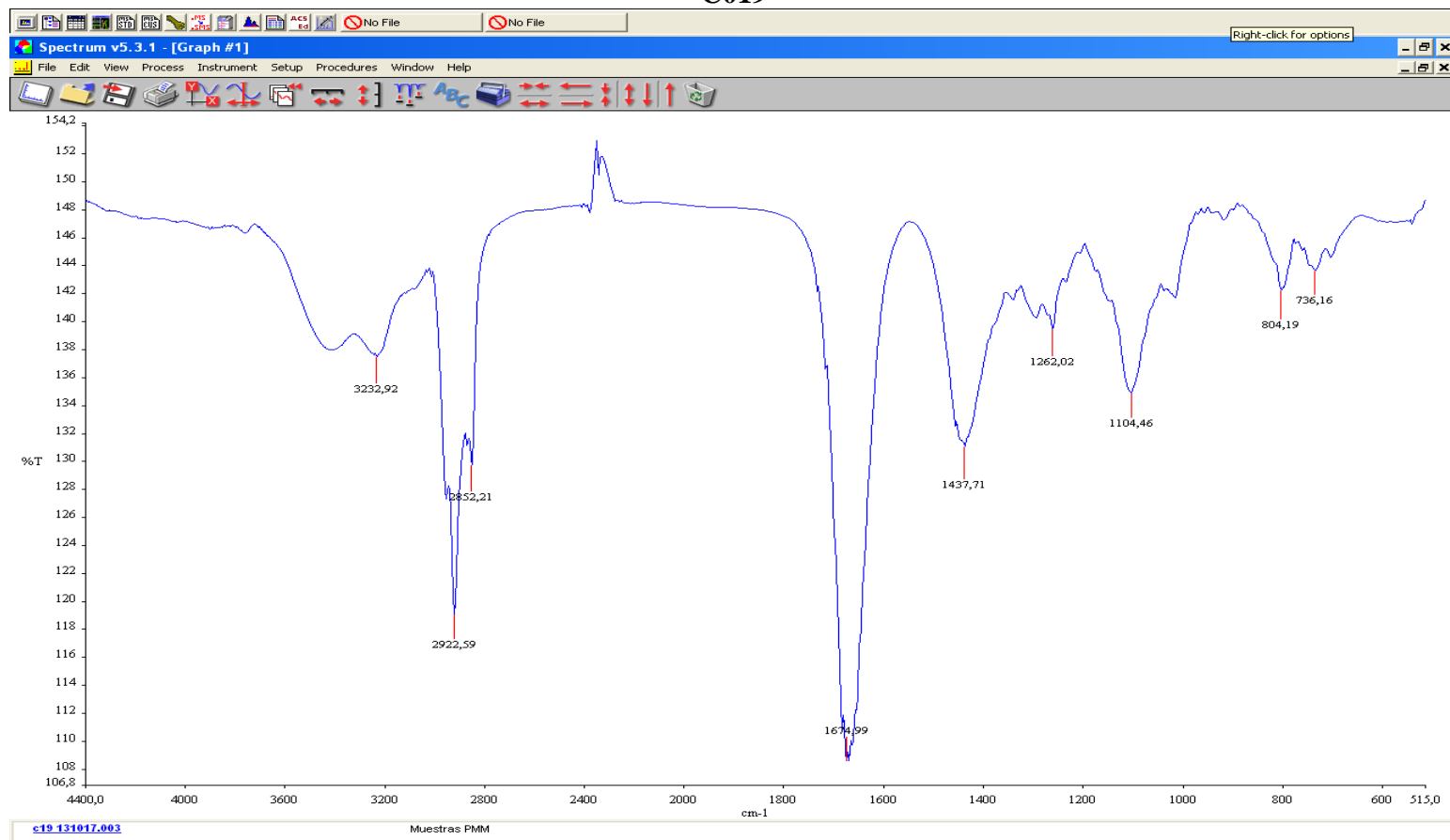
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 7. Espectros infrarrojos de las cepas productoras de antibióticos. C007



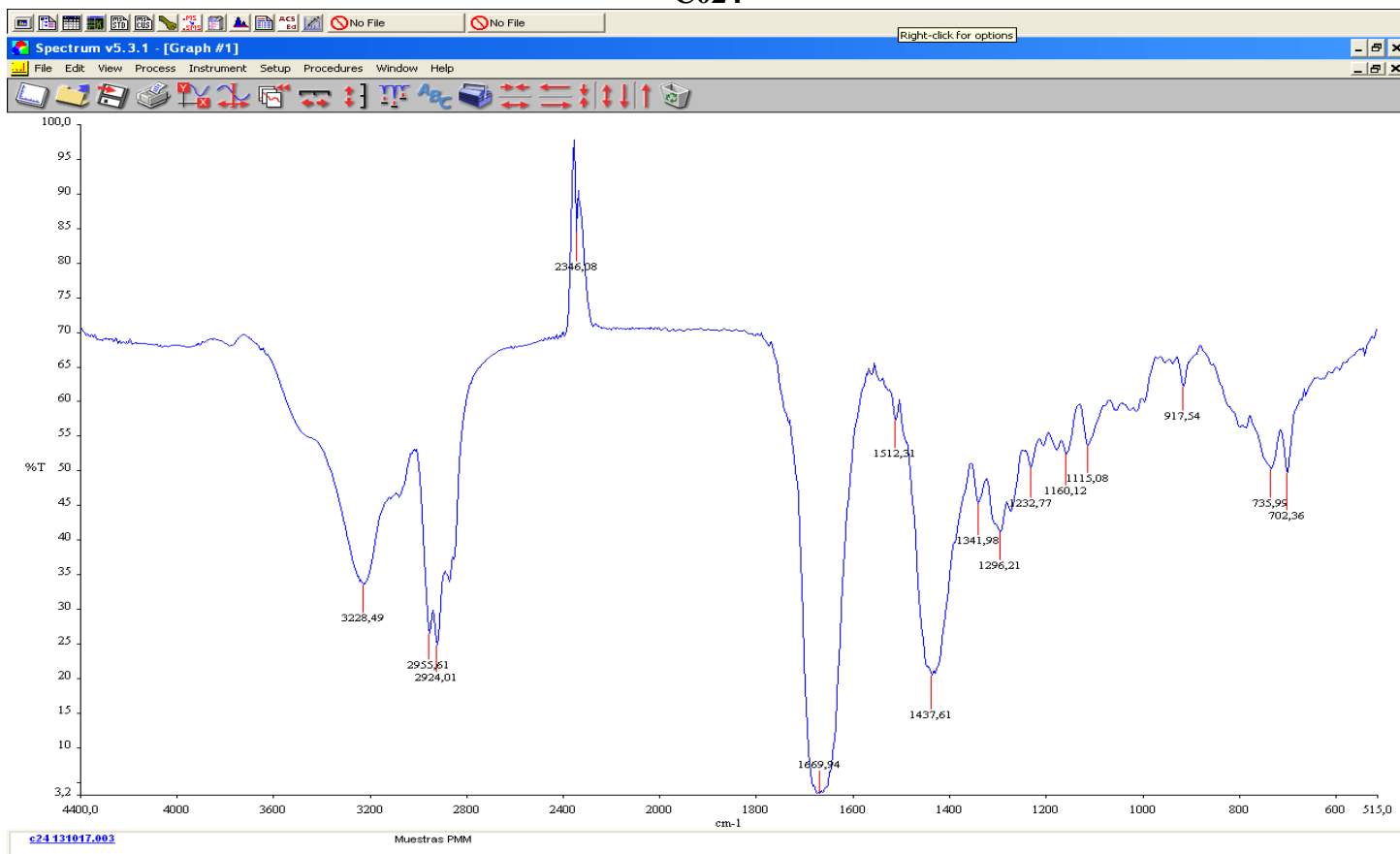
Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

C019



Nota: Elaborado por: El autor, 2018.

C024



Nota: Elaborado por: El autor, 2018.